

09/555534

H 00.03.99

MODULARIO
I.C.A. - 106



Mod. C.E. - 1-4-7

PCT/EP+ 98/07721

MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

EP 98/07721



REC'D 15 MAR 1999

WIPO PCT

S
INV. IND.

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per

N. RM97A000743

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati*

*risultano dall'accluso processo verbale di deposito ed inoltre: verbale di
scioglimento della riserva protocollo n. RM90091 del 30.01.1998 della descrizione
con disegni (pagg. 71); istanza per la presda in cura protocollo n. 803640 del
15.10.1998 depositata presso l'UIBM (pagg. 3); verbale UPICA di Milano n.
MI-E 000907 per la cessione a favore dell'Istituto Superiore di Sanità con sede in
Roma (pagg. 8); istanza di correzione e integrazione protocollo n. 803745 del
20.10.1998 (pagg. 131); istanza di correzione formale protocollo n. 803901 del
30.11.1998 (pag. 3).*

28 DIC. 1998

REGGENTE

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE
D.ssa Paola Di CINTIO

Paola Di CINTIO

1354PTIT

PCT/EP+ 98/07721

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

MODULO A

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE DEPOSITO RISERVE ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione: Ensoli Barbara N.G. PE/

Residenza: Via Feste Avieno, 176 - 00136 ROMA codice: NSLBBR60A63E472K

2) Denominazione: _____

Residenza: _____ codice: _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome: Maria Vittoria Primiceri ed altri cod. fiscale: _____

denominazione studio di appartenenza: NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

Via: Savoia 82 città: ROMA codice: 00198 RM

C. DOMICILIO ELETTIVO (semplice)

D. TITOLO

Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli od in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate.

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI NO

DE STANZA DATA

E. INVENTORI DESIGNATI

1) Barbara Ensoli cognome nome

2) _____ 3) _____ 4) _____

F. PRIORITÀ

azione o organizzazione	data di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato	scoglimento riserve
				§ 2	Data e N° Protocollo
1) <u>Nessuna</u>					
2) _____					

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

Nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N° es	pag	av	descrizione
Doc. 1) <u>1</u>	<u>XXV</u>	<u>24</u>	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2) <u>1</u>	<u>XXV</u>	<u>9</u>	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3) <u>1</u>	<u>XXV</u>		lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale
Doc. 4) <u>0</u>	<u>XXV</u>		designazione inventore
Doc. 5) <u>0</u>	<u>XXV</u>		documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6) <u>0</u>	<u>XXV</u>		autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7) <u>0</u>	<u>XXV</u>		nominativo completo del richiedente

3) attestato di versamento iniziale lire Cinquecentosessantacinquemila obbligatorio

COMPILATO IL 02/12/1997

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE

Dr.ssa Maria Vittoria PrimiceriCONTINUA SI/NO NODEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SIUFFICIO PROVINCIALE IND COMM ART DI ROMARM 97 A 000743codice 58

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

L'anno millenovecento nocantasetteil giorno unodel mese di Dicembreil/i richiedente/i sopraindicato/i ha(hanno) presentato e sottoscritto la presente domanda, composta di n° 00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

timbro
dell'UfficioL'UFFICIALE ROGANTE
Ufficiale Rogante

TIT

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

NUMERO BREVETTO

RM 97 A 000743

DATA DI DEPOSITO 01 / 12 / 1997

DATA DI RILASCIO

PROSPETTO A

4. RICHIEDENTE (1)

Denominazione

Residenza

Ensoli Barbara

5. TITOLO

Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli od in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate.

Classe proposta (sez. cl. sci.)

(gruppo/sottogruppo)

6. RIASSUNTO

La presente invenzione concerne un vaccino, profilattico e terapeutico, anti-HIV, anti-AIDS e contro i tumori e le sindromi associate all'infezione da HIV che utilizzi proteine, peptidi e DNA (wild-type o mutati) del Tat di HIV, da solo od associato a proteine, peptidi e DNA di altri prodotti virali (Nef, Rev, Gag) o di citochine ad effetto potenziante la risposta immune antivirale. L'invenzione prevede anche la immunizzazione tramite cellule dendritiche autogene, l'immunizzazione mucosale o l'immunizzazione ex vivo di cellule del sangue periferico espanse tramite co-stimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti CD28.



7. DISEGNO

1354PTIT

DESCRIZIONE

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

a corredo di una domanda di brevetto per l'invenzione industriale dal titolo:

"Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli od in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate"

A nome di: Barbara Ensoli
Inventori: Barbara Ensoli

RM 97 A 0007/3

La presente invenzione concerne un vaccino, profilattico e terapeutico, anti-HIV, anti-AIDS e contro i tumori e le sindromi associate all'infezione da HIV che utilizzi proteine, peptidi e DNA (wild-type o mutati) del Tat di HIV, da solo od associato a proteine, peptidi e DNA di altri prodotti virali (Nef, Rev, Gag) o di citochine ad effetto potenziante la risposta immune antivirale. L'invenzione prevede anche la immunizzazione tramite cellule dendritiche autologhe, l'immunizzazione mucosale o l'immunizzazione ex vivo di cellule del sangue periferico espanse tramite co-stimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28.

Stato dell'arte

L'AIDS (sindrome da immunodeficienza acquisita) è causata dal virus HIV e caratterizzata da immunodeficienza, insorgenza di tumori soprattutto il sarcoma di Kaposi (KS) e linfomi a cellule B, infezioni opportunistiche ed alterazioni del sistema nervoso centrale. Poiché l'AIDS è diffusa in tutto il mondo ed ha un'elevata mortalità, uno degli obiettivi più importanti di sanità pubblica è lo sviluppo di un vaccino anti-HIV profilattico e/o terapeutico. A tale scopo è stato principalmente utilizzato come immunogeno l'envelope virale o sue subunità, ma i risultati sono stati insoddisfacenti per l'estrema variabilità dell'envelope virale [Wain-Hobson, Curr. Opin. Genet. Dev. 3:878 (1993); Myers et al., Human Retroviruses and AIDS, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, NH, 1995]. Pertanto si ritiene che, in alternativa all'immunità sterilizzante, possa essere sufficiente ottenere il blocco della progressione dell'infezione (vaccino terapeutico). Inoltre, risposte immuni protettive possono essere ottenute utilizzando come immunogeni regioni di DNA dell'agente patogeno [Lu et al., J. Virol. 70:3978 (1996); Boyer et al., Nature Med. 3:526 (1997)]. In considerazione dei dati sperimentali pubblicati, l'inventore ritiene necessario utilizzare un vaccino allestito con prodotti virali diversi da env che siano più conservati tra i vari isolati di HIV in grado di indurre un'efficace risposta immune sia umorale che cellulare, e che abbiano una funzione vitale per il virus.

Questi debbono essere sperimentati nel modello dei primati non umani in quanto il sistema immune è più simile a quello dell'uomo di quello di animali filogeneticamente più distanti e nei quali si sviluppa AIDS dopo infezione. La proteina regolatrice Tat di HIV-1 possiede tutti questi requisiti: è conservata, immunogenica ed essenziale per le fasi precoci dell'infezione virale. Inoltre Tat svolge un ruolo fondamentale non solo nella replicazione virale e nella trasmissione e progressione dell'infezione, ma anche come fattore di insorgenza e di progressione dei tumori associati all'AIDS, quali il KS che è il tumore più frequente associato all'AIDS, e di altre sindromi e sintomi che insorgono dopo l'infezione da HIV.

Tat è una proteina di 86-102 aminoacidi, a seconda dei ceppi virali, codificata da due esoni. Tat è prodotta precocemente dopo l'infezione, si localizza nel nucleo e transattiva l'espressione dei geni virali interagendo con la sequenza bersaglio "Tat-responsive element" (TAR) dell'LTR [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Tat potrebbe anche avere un ruolo nella virulenza di HIV tramite altri meccanismi di azione nel ciclo virale [Huang et al., EMBO J. 13:2886 (1994); Neuve et al., J. Virol. 70:5572 (1996); Harrich et al., EMBO J. 16:6 (1997); Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:8116 (1997)]. Il prodotto del primo esone (aminoacidi 1-72) è conservato in diversi isolati virali [Myers et al., Human retroviruses and AIDS, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, (1995)] ed è sufficiente per la transattivazione di HIV-1 [Chang et al., J.

Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Esso contiene 4 domini. Il dominio acidico (aminoacidi 1-21) è importante per l'interazione di Tat con proteine cellulari; la regione ricca in cisteine (aminoacidi 22-37) rappresenta il dominio di transattivazione. Questa regione è la più conservata negli isolati primari [Meyerhans et al., Cell 58:901 (1989)]. La sostituzione della cisteina 22 con una glicina abolisce la capacità di Tat di transattivare l'HIV-LTR [Yang et al., J. Virol. 70:4576 (1996)]; la regione core (aminoacidi 38-48) è anch'essa conservata ed importante per l'attivazione, e la sostituzione della lisina 41 con una treonina inattiva l'attività transattivante di Tat sull'LTR di HIV [Kashanchi et al., J. Virol. 70:5503 (1996)]; il dominio basico (aminoacidi 49-57), ricco in arginine e lisine, è necessario per la localizzazione nucleare e lega specificamente il suo RNA bersaglio (TAR) [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Inoltre, la regione basica è responsabile del legame del Tat extracellulare all'eparina e agli eparan solfati proteoglicani (HSPG) [Chang et al., AIDS 11:1421 (1997)]. Mutazioni nella regione basica aboliscono queste interazioni. La porzione carbossi-terminale di Tat non è necessaria per la transattivazione dell'LTR, ma contiene una sequenza arginina-glicina-acido aspartico (RGD), normalmente presente nelle proteine della matrice extracellulare (ECM), responsabile del legame di Tat ai recettori integrinici $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ e degli effetti di Tat sui tumori associati all'AIDS e sul sistema immune, vascolare e nervoso [Barillari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 149:3727 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994); Zauli et al., Blood 80:3036 (1996); Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Durante l'infezione acuta delle cellule T con HIV-1 o dopo transfezione del gene *tat* in cellule COS-1, la proteina Tat è rilasciata in assenza di morte cellulare nell'ambiente extracellulare [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Il rilascio di Tat dalle cellule infettate avviene anche *in vivo* poiché Tat è presente nel siero di soggetti infetti [Westendorp et al., Nature 375:497 (1995)] e nelle lesioni AIDS-KS [Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)]. Dopo il rilascio, una parte della proteina rimane in forma solubile mentre l'altra si lega agli HSPG della ECM. Tat legato agli HSPG può essere recuperato in una forma solubile dall'eparina. Il legame con l'eparina è dovuto alla regione basica di Tat, previene gli effetti del Tat extracellulare e protegge la proteina dall'ossidazione tanto da averci consentito la purificazione di Tat con alta attività biologica [Chang et al., AIDS 11:1421 (1997)]. Tat extracellulare può essere internalizzato dalle cellule, può migrare nel nucleo e transattivare l'espressione del genoma virale [Frankel et al., Cell 55:1189 (1988); Mann et al., EMBO J. 10:1753 (1991); Marcuzzi et al., J. Virol. 66:4228 (1992); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. L'internalizzazione di Tat avviene per endocitosi mediata dal legame dell'RGD all' $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ [Barillari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7941 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)] e/o tramite endocitosi mediata dalla regione basica che si lega agli HSPG.

Tat può attivare la replicazione virale e la diffusione dell'infezione anche tramite meccanismi indiretti che coinvolgono la modulazione dell'espressione di geni cellulari, che hanno un ruolo chiave nel controllo della sopravvivenza cellulare, e di citochine infiammatorie con effetto sulla replicazione virale [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)].

Oltre ad essere essenziale per la replicazione del virus, Tat svolge un ruolo molto importante nella patogenesi dell'AIDS. Tat è in grado di modulare la sopravvivenza e proliferazione di cellule infettate e non infettate determinando l'attivazione o repressione di citochine, quali IL-2 [Puri et al., AIDS Res. 11:31 (1995); Westendorp et al., J. Virol. 68:4177 (1994); Chirmule et al., J. Virol. 69:492 (1995)], o di geni che svolgono un ruolo chiave nel ciclo cellulare [Sharma et al., Biochem. Biophys. Res. Co. 208:704 (1995); Zauli et al., Blood 86:3823 (1995); Li et al., Science 268:229 (1995); Westendorp et al., Nature 375:497 (1995); Gibeilini et al., Blood 89:1654 (1997)]. Gli effetti anti- o pro-apoptotici di Tat dipendono da diversi fattori quali il tipo cellulare, dal fatto che Tat sia espresso dalla cellula o aggiunto alla cellula, e dalla sua concentrazione [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Zauli et al., J. Immunol. 157:2216 (1996)].

Tat è il fattore responsabile dell'aumentata frequenza ed aggressività del KS in soggetti infettati da HIV-1 [Ensoli et al., AIDS Updates, Eds. V. De Vita, Jr., Hellman S., Rosenberg S.A., Lippincott J.B., Philadelphia: 7: 1 (1994); Corallini et al., Cancer Res. 53: 1 (1993)]. Il KS è un tumore di origine vascolare e la neoplasia più frequente in soggetti infettati dal virus. Tat induce le cellule KS e le cellule endoteliali attivate da citochine infiammatorie (IC) a migrare, esprimere collagenasi IV, invadere la ECM e proliferare, processi necessari per l'angiogenesi e l'invasione tumorale. [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994); Albini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4838

(1995); Fiorelli et al., J. Clin. Invest. 95:1723 (1995)]. Questi effetti del Tat sono indotti dalle IC₁, poiché esse stimolano l'espressione dei recettori per Tat, l' $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ [Barillari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 7941 (1993)]. Tat mima l'effetto delle proteine della ECM, quali la fibronectina e la vitronectina e la regione contenente la sequenza RGD e la regione basica sono necessarie per gli effetti del Tat extracellulare sulle cellule KS, sull'angiogenesi e sulla progressione del KS. La dimostrazione della presenza di Tat extracellulare e del suo legame in vivo ai recettori per il Tat nelle lesioni AIDS-KS [Ensoli et al., Nature 345: 84, 1994] sostiene l'idea che Tat sia coinvolto nell'insorgenza e nel mantenimento del KS associato all'AIDS. Inoltre topi transgenici per il gene *tat* sviluppano tumori tipo KS o di altro fenotipo a seconda del livello di espressione del transgene [Vogel et al., Nature 335: 601 (1988); Corallini et al., Cancer Res, 53: 5569 (1993)].

E' stato suggerito che Tat svolga anche un ruolo nei fenomeni iperproliferativi e nella patogenesi dei linfomi B frequentemente osservati in individui sieropositivi ed in topi-transgenici per *tat* [Vellutini et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 11:21 (1995)], tramite meccanismi che coinvolgono l'aumento dell'espressione di bcl-2 e di citochine [Puri et al., Cancer Res., 52:3787 (1992)]. Altre evidenze confermano un possibile ruolo di Tat nell'oncogenesi [Kim et al., Oncogene 7: 1525 (1992)].

Tat può anche attivare l'espressione di promotori virali quali quelli degli herpesvirus ed altri virus che si riattivano in soggetti con AIDS favorendo l'insorgenza e la progressione di infezioni opportunistiche [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)].

Tat infine, sembra anche esercitare effetti neurotossici sia diretti, tramite la regione basica e l'RGD, che indiretti tramite l'induzione di citochine infiammatorie ad effetto tossico sui neuroni del sistema nervoso centrale o sulla barriera ematoencefalica [(Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. In soggetti adulti ed in soggetti pediatrici le alterazioni del sistema nervoso centrale possono portare a demenza e ad alterazioni dell'apprendimento e del comportamento, rispettivamente.

Per quanto riguarda la risposta immune al Tat, diversi studi suggeriscono che gli anticorpi anti-Tat hanno un ruolo protettivo e possono controllare l'evoluzione della malattia in vivo [Reiss et al., J. Med. Virol. 30:163 (1990); Rodman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7719 (1993); Rodman et al., J. Exp. Med. 175:1247 (1992); Re et al., J. Acquir. Immun. Defic. Syndr. 10:408 (1996)]. Inoltre, in vitro, anticorpi anti-Tat, non solo sopprimono l'internalizzazione, l'attivazione trans-cellulare di Tat e l'infezione [Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Re et al., J. Acq. Immun. Def. Synd. 10:408 (1995)], ma inibiscono anche la proliferazione, la migrazione indotta da Tat di cellule AIDS-KS e la formazione di lesioni simil-KS indotte da nel topo [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)]. Infine, i nostri risultati preliminari indicano che anticorpi anti-Tat sono assenti in soggetti con AIDS-KS suggerendo che questi individui non possiedono attività anticorpali bloccanti il Tat extracellulare e, pertanto, questa proteina possa agire indisturbata.

Lo sviluppo di una risposta cellulo-mediata anti-Tat nella fase iniziale dell'infezione è importante nel controllo dell'infezione [Voss et al., Virology 208:770 (1995); Rinaldo et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 11:481 (1995); Harrer et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 12:585 (1996)] ed esiste una correlazione inversa tra la presenza di CTL specifiche anti-Tat e la progressione della malattia [van Baal et al., J. Gen. Virol. 78:1913 (1997)]. Simili risultati sono stati ottenuti da studi condotti su macachi inoculati con SIVmac [Lu et al., J. Virol. 70:3978 (1996); Venet et al., J. Immunol. 148:2899 (1992)]. Inoltre recenti studi in topi di varia specie in cui il Tat è stato inoculato sia sotto forma di plasmide che di proteina hanno indicato che è possibile indurre una risposta sia umorale che cellulare verso la proteina [Hinkula et al., J. Virol. 71:5528 (1997)] benché si sia osservata variabilità da specie a specie di topo e questi risultati non siano stati riprodotti con gli stessi immunogeni in uno studio sui primati non umani [Quesada-Rolander et al., ABS 6-S1, 2nd European Conference on Experimental AIDS Research, Stockholm, Sweden, May 31-June 3 (1997)]. La mancanza di riproducibilità della sperimentazione vaccinale nel topo rispetto a quella dei primati non umani è frequente e probabilmente dovuta al sistema immune che è differente nelle due specie animali e che può dar luogo a risposte immuni differenti con lo stesso immunogeno, come evidenziato per l'HIV con la proteina Env del virus. Ciò richiede che gli immunogeni candidati per le sperimentazioni vaccinali per l'uomo siano saggiati nei primati non umani e non solo in specie inferiori.

L'inventore ritiene che altre proteine virali, o loro parti, possano essere associate al Tat e potenziare una risposta immunitaria specifica contro l'HIV, ed essere di beneficio anche per la vaccinazione contro l'insorgenza di tumori e di altre patologie o sintomi associati all'infezione di HIV. Questi prodotti sono le proteine Nef, Rev e Gag di HIV.

Il Nef è un'altra proteina regolatrice virale importante per lo sviluppo della malattia [(Allan et al., *Science* 230:813 (1985); Franchini et al., *Virology* 155:593 (1986); Guy et al., *Nature* 330:266 (1987)] prodotta precocemente dopo l'infezione e rilasciata nell'ambiente extracellulare. Nel sistema STVmac/macaco la presenza di Nef correla con alte dosi di carica virale e con la progressione verso l'AIDS [(Kestler et al., *Science* 248:1109 (1991)). Il Nef è più variabile del Tat [(Myers et al., *Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics*. Los Alamos, NH (1995)). Nef è una proteina immunogenica [(Gobert et al., *Virology* 176:458 (1990); Choppin et al., *J. Immunol.* 147:569 (1991); Culman et al., *J. Immunol.* 146:1560 (1991); Tahtinen et al., *Virology* 187:156 (1992)], ed è capace di indurre CTL [(Bourgault et al., *J. Virol.* 66:75 (1992); Couillin et al., *J. Exp. Med.* 180:1129 (1994)]. In particolare è stata evidenziata una regione immunodominante nella regione centrale di Nef (regione 73-144) che è riconosciuta dalla maggior parte dei pazienti con CTL anti-Nef.

Rev è una proteina regolatrice virale prodotta precocemente durante l'infezione [Gait et al., *Trends Biochem. Sci.* 18:255 (1993); Parslow, *Human Retroviruses*, Ed. B.R. Cullen, IRL press, Oxford, England, p. 101 (1993)] e rilasciata nell'ambiente extracellulare. Rev è essenziale per la replicazione di HIV e la progressione della malattia, ed è codificata da due esoni, parzialmente sovrapposti a quelli codificanti per Tat. Rev è una proteina nucleare [Felber et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:1495 (1989)] necessaria per l'espressione degli RNA messaggeri virali per le proteine tardive [Malim et al., *Nature* 338:254 (1989)]. Rev è una proteina altamente conservata fra i diversi isolati virali di HIV-1 [Meyers et al., *Human Retroviruses and AIDS: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*, Los Alamos Laboratory, Los Alamos, NM p.1 (1993)] ed è immunogenica. Induce, infatti, la produzione di anticorpi specifici diretti contro i due domini funzionali della proteina [Pilkington et al., *Mol. Immunol.* 33:439 (1996)] durante l'infezione naturale nell'uomo [Reiss et al., *AIDS Res. Hum. Retrov.* 5:621 (1989)] e dopo inoculazione nel topo [Hinkula et al., *J. Virol.* 71:5528 (1997)]. La diminuzione dei livelli sierici degli anticorpi anti-Rev sembra correlare con la progressione verso l'AIDS [Reiss et al., *AIDS Res. Hum. Retrov.* 5:621 (1989)]. Rev è in grado di indurre CTL sia nell'uomo che nella scimmia [van Baalen et al., *J. Gen. Virol.* 78:1913 (1997); Venet et al., *J. Immunol.* 148:2899 (1992)] ed è stato riportato che una risposta CTL specifica anti-Rev, precocemente durante l'infezione, correla inversamente con la progressione della malattia [van Baalen et al., *J. Gen. Virol.* 78:1913 (1997); Venet et al., *J. Immunol.* 148:2899 (1992)].

Un'altro bersaglio virale è rappresentato dal gene gag che è espresso tardivamente durante l'infezione e codifica per un gruppo di proteine strutturali del capsido altamente immunogeniche [Bruisten et al., *J. Infect. Dis.* 166:620 (1992); Sipsas et al., *J. Clin. Invest.* 99:752 (1997)]. I titoli anticorpali anti-Gag rimangono elevati e stabili nella fase asintomatica dell'infezione, mentre diminuiscono a livelli molto bassi quando l'infezione progredisce ad AIDS conclamato, in concomitanza con il calo dei linfociti CD4+ e il ritrovamento del virus nel sangue [Baur et al., *J. Infect. Dis.* 165:419 (1992); Koup et al., *J. Virol.* 68:4650 (1994)]. Le proteine del Gag inducono attività CTL precocemente durante l'infezione, sia nell'uomo che nei primati [Mefarland et al., *J. Inf. Dis.* 170:766 (1994); Yasutomi et al., *J. Virol.* 70:678 (1996)], e la loro presenza correla significativamente con il controllo della viremia iniziale e della progressione della malattia [Klein et al., *J. Exp. Med.* 181:1365 (1995); Aryoshi et al., *AIDS* 9:555 (1995); Rinaldo et al., *J. Virol.*, 69:5838 (1995); Yang et al., *J. Virol.* 70:5799 (1996); Lubaki et al., *J. Infect. Dis.* 175:1360 (1997)]. Infine, le proteine p17 e p24 contengono epitopi immunodominanti che sono conservati tra diversi isolati di HIV-1 e HIV-2 e riconosciuti da CTL [Littau et al., *J. Virol.* 65:40 (1991); Buseyne et al., *J. Virol.* 67:694 (1993); Nierfield et al., *J. Immunol.* 154:2189 (1995); van Baalen et al., *J. Gen. Virol.*, 77:1659 (1996); Nixon et al., *Nature* 336:484 (1988)].

L'inventore ritiene che citochine, o loro parti, quali l'IL-12 e l'IL-15, o altre citochine ad azione immunomodulante o comunque potenziante l'effetto immunogenico di Tat possano essere utilizzate come adiuvanti nella vaccinazione anti-Tat. L'IL-12 è una potente citochina immunoregolatrice prodotta dalle cellule presentanti l'antigene quali cellule B e dendritiche [Per review vedi Trinchieri, *Curr. Opin. Hematol.*



4:59 (1997)]. L'IL-12 è prodotta precocemente dopo l'infezione da HIV ed ha azione proinfiammatoria inducendo le cellule NK e i linfociti T a produrre IFN che determina l'attivazione dei fagociti e favorisce l'induzione di linfociti Th1. L'IL-12 svolge un ruolo fondamentale nell'aumentare la resistenza nei confronti di molte infezioni causate da batteri, funghi, virus ed ha un'elevata attività antitumorale. Si pensa che i meccanismi che inducono un'immunodepressione, quali l'HIV e il virus del morbillo, agiscano anche attraverso meccanismi che sopprimono la produzione di IL-12. [Grosjean et al, J. Exp. Med. 186: 801 (1997); F. Vivier et al, J. Exp. Med. 186: 813 (1997) Schnorr et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 5326 (1997)].

L'IL-15 è una citochina pleiotropica espressa dai tessuti non linfoidi, dai monociti/macrofagi attivati e dalle cellule dendritiche [Quinn et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 239:6 (1997); Jonuleit et al., J. Immunol. 158:2610 (1997)]. L'IL-15 svolge un ruolo importante nella regolazione dell'attività NK, della proliferazione dei linfociti T e dell'attività CTL [Jullien et al., J. Immunol. 158:800 (1997); Carson et al., J. Clin. Invest. 99:937 (1997)]. L'IL-15 induce l'espansione dei CTL contro antigeni di HIV, in assenza di IL-2 e linfociti T CD4+ funzionali [Kanai et al., J. Immunol. 157:3681 (1996); Agostini et al., Blood 90:1115 (1997)]. Inoltre, l'IL-15 come l'IL-2, induce la comparsa di linfociti dotati di attività citotossica ("lymphokine-activated killer", LAK) e stimola la produzione di IFN γ nei PBMC di pazienti sieropositivi [Lucey et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4:43 (1997)]. L'IL-15 attiva i monociti a produrre chemochine, svolgendo un ruolo di regolazione nell'innescare dei processi infiammatori [Badolato et al., Blood 90:2804 (1997)].

Nell'ambito dei diversi sistemi volti alla generazione di vaccini efficaci antivirali ed antitumorali, l'inventore ritiene che l'utilizzazione di cellule dendritiche possa essere un elemento chiave nell'induzione della risposta immune al Tat. Ciò è dovuto al fatto che queste sono le cellule più efficienti nel presentare l'antigene e le uniche in grado di stimolare linfociti vergini, in assenza di adiuvanti [Steinman R.M., Exp. Hematol. 24: 859 (1996)]. L'uso di cellule dendritiche sostituisce la funzione di numerosi adiuvanti che consiste nell'indurre una risposta immunitaria non specifica (immunità naturale) che a sua volta in presenza dell'antigene genera una potente risposta specifica primaria.

Poiché la trasmissione dell'infezione da HIV avviene prevalentemente a livello mucosale (genitale e rettale nell'adulto, orale nel neonato), l'inventore ritiene che l'induzione di immunità protettiva a livello mucosale è un obiettivo di primaria importanza. Numerosi studi hanno recentemente dimostrato la possibilità di indurre immunizzazione mucosale locale e sistemica. In particolare la via nasale e quella orale si sono dimostrate fra le più efficienti nell'indurre una efficace risposta immunitaria mucosale anche in siti distanti, quali le mucose genitali [Rosenthal et al., Seminars in Immunology 9:303 (1997); O'Hagan et al., Novel Delivery Systems for Oral Vaccines. Eds. O'Hagan, D.T. CRC Press Boca Raton, FL, p. 176 (1994)].

Studi recenti hanno dimostrato che la costimolazione di linfociti CD4+ con biglie paramagnetiche ricoperte con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 determina l'espansione logaritmica e policlonale dei linfociti provenienti da soggetti infetti con HIV [Levine et al., Science. 272: 1939-1943 (1996)] senza attivare la replicazione e la propagazione del virus. Questa attività antivirale è conseguente alla modulazione negativa dell'espressione di CCR5, il corecettore per i ceppi monocitotropi dell'HIV-1 [Carroll et al., Science. 276: 273-276. (1997)] e in misura minore agli elevati livelli di chemochine indotti mediante costimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 [Riley et al, J.Immunol. 158: 5545-5553, (1997)]. L'inventore ritiene che la possibilità di espandere linfociti autologhi da soggetti infettati con HIV in assenza di replicazione/propagazione virale consente di approntare un'efficace immunizzazione *ex vivo*, descritto negli esempi, che può essere di grande utilità nell'allestimento di un vaccino anti-Tat.

L'inventore ritiene che queste osservazioni suggeriscono che l'immunizzazione con Tat da solo o combinato con altri prodotti virali o citochine immunomodulanti, o loro parti, potrebbe bloccare la replicazione virale in soggetti esposti dopo la vaccinazione e in soggetti già infetti, mantenendo l'infezione in uno stadio abortivo che, pertanto, potrebbe essere controllata più facilmente dal sistema immune. Pertanto l'inventore ritiene che un vaccino basato sul Tat dovrebbe essere in grado di indurre una risposta immunitaria, sia umorale che cellulare, sufficiente a bloccare o ridurre la replicazione o la trasmissione del virus e quindi a

proteggere dall'infezione, dalla malattia e dall'insorgenza dei tumori e di altre sindromi e sintomi associati all'AIDS. È possibile, quindi, impiegare il vaccino anti-Tat a scopi sia di prevenzione che di terapia. Infatti una risposta umorale contro Tat potrebbe neutralizzare gli effetti di Tat extracellulare riducendo e limitando l'infezione, e gli effetti del Tat extracellulare, mentre la risposta cellulo-mediata verso Tat e altre proteine virali, incluse nella formulazione vaccinale, dovrebbe distruggere le cellule replicanti il virus e, quindi, contenere l'infezione, e dare tempo sufficiente al sistema immune dell'ospite di sviluppare una risposta immune completa verso tutte le componenti virali in assenza di danni irreparabili dovuti all'alta replicazione virale.

Rivendicazioni

L'oggetto dell'invenzione riguarda:

1. un vaccino proteico o peptidico da applicare all'uomo, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi ed i sintomi associati all'infezione da HIV, che comprende proteine ricombinanti del Tat wild type e dei suoi mutanti (Seq. 1-5), espresse e purificate come descritto, o dei suoi peptidi wild-type e mutanti (Pep. 1-7), che siano somministrati da soli o coniugati con l'epitopo T-helper universale del tossoide tetanico o altri peptidi T-helper;
2. un vaccino come descritto sopra, combinato con proteine ricombinanti o peptidi di Nef, Rev o Gag di HIV, oppure somministrato sotto forma di proteine di fusione Tat/Nef, Tat/Rev, Tat/Gag o parte delle stesse;
3. un vaccino come descritto sopra, in combinazione con proteine ricombinanti di citochine immunomodulatorie, quali IL-12, IL-15 od altre molecole, o parti delle stesse, potenzianti la risposta immune antivirale, oppure somministrato sotto forma di proteine di fusione Tat/IL-12, Tat/IL-15 o Tat/alte molecole, o parte delle stesse, potenzianti la risposta immune antivirale;
4. un vaccino a DNA da applicare all'uomo, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi ed i sintomi associati all'infezione da HIV, che comprende vettori che codificano Tat wild-type o i suoi mutanti (Seq. 1-5), o parti di essi, inseriti nel vettore plasmidico pCV0 o altri vettori;
5. un vaccino a DNA come descritto al punto 4, in combinazione con molecole di DNA, inserite nel vettore plasmidico pCV0 o altri vettori, dei geni rev, nef e gag di HIV, o parte degli stessi, oppure somministrato sotto forma di plasmide co-esprimente tat/rev, tat/nef, tat/gag o parte degli stessi;
6. un vaccino a DNA come descritto sopra, in combinazione con molecole a DNA, basate sul plasmide pCV0 o altri vettori, dei geni per le citochine immunomodulatorie IL-12, IL-15 o altri geni immunomodulatori, o parte degli stessi, potenzianti la risposta immune antivirale, oppure somministrato sotto forma di plasmide co-esprimente tat/IL-12, tat/IL-15 o tat/alte molecole, o loro parti, in grado di potenziare la risposta immune antivirale;
7. un vaccino anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA da solo o combinato come sopra, descritto per l'immunizzazione con cellule dendritiche autologhe mediante trattamento ex vivo;
8. un vaccino anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA, da solo o combinato come sopra descritto per l'immunizzazione mucosale (nasale, orale, vaginale o rettale);
9. un vaccino anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA, da solo o combinato come sopra descritto, per l'immunizzazione ex vivo di cellule dal sangue periferico di soggetti infettati che siano espansi tramite co-stimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 ed anti-CD28 e reinfuse nell'ospite;
10. un vaccino terapeutico anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA, come descritto, combinato con inibitori della replicazione virale.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione concerne un vaccino, profilattico e terapeutico, contro l'infezione da HIV, la progressione verso l'AIDS, lo sviluppo di tumori e di altre sindromi e sintomi insorgenti in soggetti infettati dal virus, che utilizzi molecole ricombinanti, proteiche, peptidiche e a DNA di Tat di HIV. Più in particolare, l'invenzione concerne un vaccino basato su Tat di HIV-1 come immunogeno, inoculato sotto forma di DNA e/o di proteina ricombinante o di peptidi, da solo o in combinazione con altri geni o prodotti genici virali (Nef, Rev, Gag) o parti di esse, oppure in combinazione con diverse citochine immunomodulatorie (IL-12, IL-15) o il gene codificante per una citochina immunomodulatrice o parte di esse. Tat, Nef, Rev, Gag e le citochine immunomodulatorie sono somministrati sia sotto forma di una miscela di proteine ricombinanti, di

peptidi o di proteine di fusione (Tat/Nef, Tat/Rev, Tat/Gag, Tat/IL-12, Tat/IL-15) che di DNA plasmidici. E' inoltre descritto un metodo di immunizzazione che utilizza cellule dendritiche autologhe trattate *ex vivo* con la proteina Tat ricombinante, o suoi peptidi, da sola, o con una miscela di proteine ricombinanti o peptidi (Tat, Nef, Rev, Gag) o con la proteina Tat e una o più citochine immunomodulatorie, o parti delle stesse, oppure trasdotte con vettori eucariotici contenenti Tat da solo, o con geni virali codificanti per Nef, Gag o Rev, oppure Tat e il gene codificante per una citochina immunomodulatrice o parte di essi. E' anche descritto l'uso per l'induzione di una risposta immune a livello mucosale. Il Tat, o suoi peptidi, da sola o in combinazione con con proteine virali e/o citochine è inoculata anche a livello mucosale per potenziare ed indurre la risposta immunitaria locale. La proteina Tat dell'HIV, o sue subunità, sarà anche utilizzata per immunizzare *ex vivo* linfociti CD4+ e CD8+ isolati dal sangue periferico di soggetti infetti. Successivamente, le cellule specifiche per l'antigene Tat saranno espanse *in vitro* mediante costimolazione con anticorpi monoclonali diretti contro il CD3 ed il CD28 e reinfuse. E' infine descritto l'uso di mutanti di Tat, identificati negli esempi, da utilizzare come immunogeni in alternativa a Tat wild type. I mutanti di Tat sono i) nella regione cisteinica (cys22) e ii) nella regione del core (lys41), iii) il mutante deleta della sequenza RGD: iv) il doppio mutante nella lisina 41 e nell'RGD. In alternativa all'uso di mutanti di Tat o peptidi di Tat (wild type o mutati in maniera analoga alla proteina) in caso di vaccinazione terapeutica si utilizzeranno, in congiunzione con l'immunogeno, inibitori della replicazione virale.

La presente invenzione verrà ora descritta in suoi esempi specifici, illustrativi, ma non limitativi, in cui si farà riferimento alle seguenti figure.

Breve descrizione delle figure:

FIGURA 1. Test di CAT per determinare la capacità della proteina Tat-cys22 (Tat22) purificata di competere con l'attività transattivante della proteina Tat wild type. Cellule H3T1, contenenti integrato nel proprio genoma il vettore "reporter" HIV-1 LTR-CAT [Sodroski et al., Science 227:171, (1985)], in cui il gene per l'enzima cloramfenicolo acetil transferasi (CAT) è posto sotto il controllo trascrizionale del promotore LTR di HIV-1, sono state incubate in presenza della proteina Tat wild type (100 ng) da sola o in combinazione con un eccesso molare di proteina Tat-cys22 (1 µg). L'attività transattivante di Tat sull'LTR di HIV-1 e la capacità della proteina Tat-cys22 di competere con Tat wild type, sono state determinate dopo 48 ore, sottoponendo aliquote degli estratti citoplasmatici (corrispondenti a 200 µg di proteine) al saggio per la determinazione dell'attività dell'enzima CAT, come descritto [Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. Sono indicate le percentuali (%) di acetilazione del ¹⁴C-cloramfenicolo.

FIGURA 2. Risposta umorale del tipo IgG specifica anti-Tat in scimmie vaccinate con la proteina Tat, determinata mediante saggi immuno-enzimatici (ELISA). (A) riporta i risultati ottenuti su due scimmie inoculate con 10 o con 100 µg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI, per via sottocutanea in un sito; (B) riporta i risultati relativi alla scimmia di controllo non inoculata. Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 5, 10, 15, 22 e 27 settimane. La presenza della risposta anticorpale anti-Tat nei plasmi degli animali vaccinati veniva valutata mediante ELISA da noi allestiti e caratterizzati. La proteina Tat, era adsorbita ai pozzetti di piastre da 96 di PVC (100 ng/pozzetto in 200 µl di tampone carbonato 0.05 M pH 9.6) per 12 ore a 4°C. Dopo 3 lavaggi con PBS-A 1x contenente Tween 20 (0.05%), si aggiungevano i sieri (in doppio) diluiti 1:50 in 200 µl di tampone carbonato, si incubava a 37°C per 90', si lavavano i pozzetti con PBS-A 1x/Tween 0.05% e si evidenziava la presenza degli immunocomplessi mediante l'aggiunta di 100 µl di anticorpo secondario (diluito 1:1000 in PBS-A 1x/Tween 0.1%/BSA 1%) coniugato con perossidasi di rafano, per 90' a temperatura ambiente. Dopo 5 lavaggi dei pozzetti, si aggiungevano 100 µl di substrato della perossidasi (ABTS 1 mM, Amersham) per 30-45' a temperatura ambiente e quindi si procedeva alla lettura spettrofotometrica a 405 nm. Ogni saggio ELISA includeva un siero policlonale di coniglio anti-Tat (controllo positivo) diluito da 1:200 a 1:6400, e i sieri delle scimmie prelevati al tempo 0 (controllo negativo) diluiti 1:50. Il valore di cut off è stato considerato come la media (± S.D.) delle letture dei sieri di tutte le scimmie, prelevati al tempo 0, ottenute in tutti gli esperimenti. I risultati riportati nell'istogramma relativi a ciascun campione corrispondono alla media delle densità ottiche

a 405 nm delle letture dei due pozzetti, sottratti del valore del cut off \pm S.D (Δ OD405). $>2,7$: i valori di lettura erano fuori scala.

FIGURA 3. Titolazione dei plasmi delle scimmie inoculate con 100 e 10 μ g di proteina Tat ricombinante, descritti nella figura 2. I risultati in ordinata sono rappresentati come il reciproco della diluizione più alta del siero che a 405 nm dava una lettura superiore al valore di cut off.

FIGURA 4. Analisi della risposta umorale anti-Tat specifica di tipo IgM in scimmie inoculate con Tat e determinata mediante saggio ELISA. Tre scimmie (M1-3) inoculate sottocute con 10 μ g di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 μ l di siero autologo e 250 μ l di RIBI e 3 scimmie (M4-6) inoculate sottocute con 10 μ g di Tat ricombinante risospesa in 250 μ l di siero autologo e 250 μ l di Alum; 2 scimmie di controllo inoculate sottocute con RIBI (250 μ l e 250 μ l di siero autologo) (M7) e con Alum (250 μ l e 250 μ l di siero autologo) (M8). Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 6, 11 e 15 settimane. L'esecuzione dei saggi ELISA e la determinazione dei valori di cut off sono descritti nella figura 2. In questo caso i sieri degli animali erano saggiati (in doppio) alla diluizione 1:100 e veniva utilizzato come anticorpo secondario un siero di capra anti-IgM di scimmia coniugato con perossidasi di rafano e diluito 1:1000.

FIGURA 5. Analisi della risposta umorale del tipo IgG specifica anti-Tat in scimmie inoculate con Tat determinata mediante saggio ELISA. Tre scimmie (M1-3) inoculate con 10 μ g di Tat ricombinante risospesa in 250 μ l di siero autologo e 250 μ l di RIBI e 3 scimmie (M4-6) inoculate con 10 μ g di Tat ricombinante risospesa in 250 μ l di siero autologo e 250 μ l di Alum; due scimmie di controllo inoculate con RIBI (250 μ l e 250 μ l di siero autologo) (M7) o con Alum (250 μ l e 250 μ l di siero autologo) (M8). Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 6, 11 e 15 settimane. L'esecuzione dei saggi ELISA e la determinazione dei valori di cut off sono descritti nella figura 2. $>2,7$: il valore era fuori scala.

FIGURA 6. Titolazione dei sieri delle scimmie inoculate con la Tat ricombinante (10 μ g) in presenza dell'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum (M4-6). I risultati sono rappresentati per ciascun siero come il reciproco della diluizione più alta del siero che a 405 nm dava una lettura superiore al valore di cut off.

FIGURA 7. Analisi della risposta di ipersensibilità ritardata a Tat mediante esecuzione dello skin test. La proteina Tat (5, 1 e 0.2 μ g), risospesa in 150 μ l di PBS contenente lo 0.1% di BSA e il tampone in cui è risospesa Tat, erano inoculati intradermicamente in un'area tricotomizzata del dorso dell'animale. L'area trattata veniva fotografata al tempo 0 e dopo 24, 48 e 72 ore. Le scimmie di controllo erano inoculate solo con il tampone. Nella figura è riportato un esempio relativo alla 15^a settimana della scimmia M2 a 48 ore dopo l'inoculazione degli immunogeni. E' evidente una forte reazione positiva a Tat.

FIGURA 8. Cinetica della risposta proliferativa di PBMC di *Macaca fascicularis* alla costimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 su biglie paramagnetiche (biglie anti-CD3/28). I PBMC isolati dal sangue periferico erano depleti della sottopopolazione CD8 positiva tramite l'impiego di metodiche immunomagnetiche. Successivamente, parte dei linfociti CD8-depleti veniva stimolata con PHA e IL-2 (40U/ml) a partire dal giorno 3; la parte rimanente veniva fatta aderire alle biglie recanti gli anticorpi anti-CD3/28 ottenendo un popolazione di linfociti CD8-depleti e CD3/28 positivi. A questa frazione veniva ~~aggiunta IL-2 (40U/ml) a partire dal giorno 10 di coltura. Le cellule erano contaminate e la loro vitalità~~ determinata ogni 2-3 giorni. Il rapporto biglie : cellule veniva mantenuto costante. E' riportato il numero di cellule nel tempo.

FIGURA 9. Effetto antivirale della costimolazione con biglie anti-CD3/28 su PBMC di *Macaca fascicularis*. I linfociti CD8-depleti e CD8-depleti CD3+/CD28+, ottenuti con le metodiche descritte nella figura 8 da 4 scimmie, venivano stimolati come descritto nell'esempio 5. Le due frazioni erano infettate *in vitro* al giorno 0 con 0.1 M.O.I. di STVmac251/63M. La stimolazione veniva effettuata con PHA e IL-2 aggiunta dal giorno 3, e con le biglie anti-CD3/28 senza aggiunta di IL-2 esogena. La produzione virale veniva valutata determinando i livelli di p27 (ng/ml) sui sovrantanati delle colture al giorno 6 e 12 dall'infezione, come descritto nell'esempio 5.

Esempio 1. Espressione, purificazione e caratterizzazione della proteina Tat (isolato IIIB), proteine mutanti del Tat e peptidi wild type e mutanti di Tat.

Notevoli difficoltà sono state incontrate in passato per la purificazione ed il mantenimento dell'attività biologica della proteina Tat a causa della facilità con la quale si ossida, si aggrega e perde attività. Ciò è dovuto all'alto contenuto in cisteine che formano legami intra- ed inter-molecolari modificando la conformazione della proteina nativa [Viscidi et al., *Science* 246:1606 (1989); Ensoli et al., *J. Virol.* 67:277 (1993)]. Il cDNA del gene *tat* (Seq. 1, esempio 2), che è stato clonato nel vettore pL-syn fornitoci dai F. DeLamarter e B. Allet (Glaxo Institute for Molecular Biology S.A., Ginevra, Svizzera), è stato usato per l'espressione della proteina in *E. coli*.

Un primo procedimento che abbiamo utilizzato e che ha portato all'ottenimento di una proteina prevedeva passaggi successivi di cromatografia liquida ad alta pressione e cromatografia a scambio [Bohan et al., *Gene Expr.* 2:391 (1992); Ensoli et al., *J. Virol.* 67:277 (1993)]. La proteina così ottenuta era pura per oltre il 95% ed attiva [Ensoli et al., *J. Virol.* 67:277 (1993); Ensoli et al., *Nature* 371:674 (1994)], tuttavia non si otteneva una buona riproducibilità da lotto a lotto, dovuta all'ossidazione della proteina, che rappresenta il problema principale con le preparazioni di Tat commerciali. In seguito alla nostra osservazione che la regione basica del Tat ha una forte affinità per l'eparina e che l'eparina ne impedisce l'ossidazione, abbiamo usato la cromatografia d'affinità con eparina e definito un nuovo protocollo di purificazione di Tat, come descritto da Chang et al., [*AIDS* 11: 1421 (1997)]. Cellule (10 gr. di peso) di *E. coli* esprimenti Tat erano sonicate in 40 ml di tampone di lisi (fosfato disodico 20mM, pH 7.8; glicerolo al 2.5%; PMSF 0.2 mM; DTT 5 mM; mannitolo 50 mM; acido ascorbico 10 mM; NaCl 500 mM) usando un Ultrasonic Liquid Processor (Modello XL2020, Heat System Inc) con tre scariche di 20 secondi ciascuna. Il lisato era centrifugato a 12.000 g per 30 minuti ed il sovrantante incubato per un'ora a temperatura ambiente con 2 ml di resina eparina sefariosio, pre-lavata con il tampone di lisi. La resina era caricata su una colonna di vetro e lavata con tampone di lisi fino a quando non era più misurata la proteina nel liquido di lavaggio. Il materiale legato era eluito con tampone di lisi contenente 2M NaCl e l'eluato raccolto in frazioni da 1 ml. L'omogeneità della proteina eluita era analizzata tramite elettroforesi su gel (SDS-PAGE). La proteina purificata era conservata liofilizzata a -70°C e risospesa in tampone degassato prima dell'uso.

L'attività biologica della proteina Tat purificata, secondo il protocollo appena descritto, era valutata con un saggio di "rescue" dell'infezione virale in cellule HLM-I, che derivano da cellule HeLa-CD4+ contenenti provirus difettivi nel gene *tat*, ottenute e descritte da Sadaie et al. [*New Biol.* 2:479 (1990)]. Il saggio di "rescue" dell'infezione virale, descritto da Ensoli et al. [*J. Virol.* 67:277 (1993)], consisteva nel complementare la mancanza di espressione di Tat nelle cellule HLM-I (2×10^5) mediante l'aggiunta di proteina Tat esogena (2 µg/ml) e valutando la replicazione virale tramite la determinazione, con un kit ELISA di "antigen capture" commerciale, della concentrazione dell'antigene p24 rilasciato nel terreno di coltura 48 ore dopo l'aggiunta della proteina Tat esogena. I risultati degli esperimenti di "rescue", descritti da Chang et al. [*AIDS* 11: 1421 (1997)], dimostrano che la proteina Tat, purificata tramite questa procedura era attiva e che questa procedura di purificazione era superiore, più semplice e meno costosa, sia per la purezza che per la sua attività biologica rispetto a quella descritta in precedenza [Ensoli et al., *Nature* 345:84 (1990), *J. Virol.* 67:277 (1993), *Nature* 371:674 (1994)].

Diverse preparazioni di Tat ricombinante purificato come appena descritto sono state inoculate in presenza di adiuvante di Freund in topi e conigli secondo protocolli standard [(Antibodies - A laboratory manual, Eds. Harlow E., Lane D., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]. I risultati relativi alla risposta anticorpale indotta dall'immunizzazione sono riportati in Tabella 1.

TABELLA 1.

Analisi della risposta anticorpale specifica anti-Tat nei sieri di topi e conigli immunizzati con la proteina Tat ricombinante^a.

Anticorpo anti-Tat	OD-ELISA/Tat			Western blot
	1:500	1:1000	1:2000	
Coniglio	0.651	0.400	0.175	+
Topo	0.502	0.240	0.150	+

^aLa proteina Tat ricombinante prodotta in *E. coli* è stata utilizzata per immunizzare topi e conigli secondo protocolli di immunizzazione standard [(Antibodies - A laboratory manual, Eds. Harlow E., Lane D., Cold Spring Harbor Laboratory (1988))].

Spring Harbor Laboratory (1988)]. I sieri degli animali immunizzati sono stati analizzati mediante saggio ELISA per la presenza di anticorpi anti-Tat utilizzando tre diluizioni del siero (1:500 a 1:2000). I risultati riportati rappresentano la media delle letture a 405 nm di due conigli e tre topi. I sieri sono stati inoltre saggiati mediante Western blot sulla proteina Tat ricombinante (100 ng) migrata in gel SDS-poliacrilamide.

I risultati della Tabella 1 dimostrano che Tat ricombinante da noi prodotta era in grado di indurre una risposta anticorpale in ambedue le specie di animali, come saggiato mediante ELISA e Western blot, utilizzando come antigene la proteina Tat ricombinante. Questi anticorpi erano in grado di inibire l'internalizzazione e le attività biologiche del Tat [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990), J. Virol. 67:277 (1993), Nature 371:674 (1994)]. Il vettore pL-syn ed il protocollo di purificazione della proteina Tat sono impiegati per esprimere e purificare i mutanti di Tat descritti nell'Esempio 2. L'attività biologica delle proteine Tat mutate purificate è misurata tramite saggi di "rescue" dell'infezione virale in cellule HLM-1, saggi di proliferazione cellulare in cellule di KS ed in vivo nel topo, come descritto sopra per la proteina Tat wild-type. Inoltre, le proteine Tat mutate sono saggiate in presenza di Tat wild-type (a concentrazioni seriali) per verificare l'effetto transdominante negativo sulla replicazione virale in saggi di "rescue" in cellule HLM-1. Il vettore pL-syn e il protocollo di purificazione sono impiegati per esprimere e purificare proteine di fusione così composte: Tat (wild type o i suoi mutanti)/IL-12 o Tat (wild type o i suoi mutanti)/IL-15 o parti delle stesse oppure Tat (wild type o suoi mutanti)/altre molecole (o parte delle stesse) che si dimostrino in grado di potenziare la risposta immune al Tat da solo od associato ad altri prodotti virali. Le molecole ricombinanti di fusione sono costruite utilizzando le sequenze e i primers descritti negli esempi 2 e 3. Alternativamente come immunogeni sono utilizzati peptidi sintetici corrispondenti a regioni di Tat o di altri prodotti virali o di citochine da usare in combinazione con Tat. Le sequenze peptidiche di Tat sono le seguenti:

Pep. 1. MEPVDPRLEPWKHPGSQPKT

Pep. 2. ACTNCYCKKCCFHCQVCFIT

Pep. 3. QVCFITKALGISYGRK

Pep. 4. SYGRKKRRQRRRPPQ

Pep. 5. RPPQGSQTHQVSLSKQ

Pep. 6. HQVSLSKQPTSQSRGD

Pep. 7. PTSQSRGDPTGPKE

I peptidi mutati di Tat conterranno le stesse sostituzioni aminoacidiche delle proteine Tat mutate descritte nell'esempio 2. I peptidi saranno utilizzati in combinazione con il peptide rappresentante l'epitopo T-helper universale del tossoide tetanico o altri peptidi T-helper [Lanzavecchia, Science 260: 937 (1993)].

Esempio 2. Costruzione e caratterizzazione dei mutanti del gene tat

Abbiamo prodotto 19 mutanti in diverse regioni di Tat, mediante mutagenesi sito specifica o per delezione. La sequenza di ciascun DNA mutato è stata controllata mediante sequenziamento. I cDNA del gene tat mutati sono stati clonati nel sito PstI del vettore pCV0, descritto nell'Esempio 3. Ciascun mutante è stato cotrasfettato, come descritto da Ensoli et al. [J. Virol. 67:277 (1993)], in cellule COS-1, o nella linea di linfociti T Jurkat, con il plasmide HIV-1 LTR-CAT, in cui il gene reporter CAT è posto sotto il controllo trascrizionale dell'LTR di HIV-1. I risultati di questi esperimenti non sono pubblicati e sono riportati in Tabella 2.

TABELLA 2.

Effetto dei mutanti di Tat sulla transattivazione dell'HIV-1 LTR-CAT ed effetto di blocco (transdominante negativo) sull'attività di Tat wild-type

MUTANTI	Attività transattivante ^a		Attività transdominante ^b
	Media (fold)	(valori min-max)	(% inibizione) Media
CYS 22	0.09	(.021-.22)	21
THR 23	0.36	(.16-1)	
THR 23A	0.30	(.16-.78)	
ASN 24	0.34	(.34-.82)	
ASN 24A	0.42	(.45-.95)	
TYR 26	0.14	(.08-.19)	
LYS 28/29	0.52	(.19-1.04)	
CYS 30	0.30	(.045-.65)	
CYS 31	0.60	(.27-1.09)	
PHE 32	0.31	(.077-.097)	
LYS 33	0.04	(.0027-.068)	46
GLU 35	0.31	(.19-.43)	
PHE 38	0.05	(.043-.057)	98
LYS 41	0.04	(.025-.061)	97
TYR 47	0.58	(.31-.8)	
57 A	0.35	(.26-.44)	
TAT-RGD	0.94	(.73-1.15)	
TAT-KGE	1.11	(.67-1.49)	
TAT wild-type	1	1	

^aI risultati sono riportati come incrementi di attivazione relativi ai valori di attività CAT indotti dal Tat wild type (Fold = 1). ^bI risultati sono espressi in percentuale (%) di inibizione dell'attività del Tat wild type.

Dai risultati presentati in Tabella 2 si osserva che per la maggior parte dei mutanti l'effetto transattivante l'LTR di HIV-1 era molto ridotto o assente, ad eccezione del mutante per delezione della sequenza RGD che aveva attività paragonabile al Tat wild-type. Abbiamo scelto i 4 mutanti (cys22, lys33, phe38, lys41) con la più bassa attività transattivante (quasi nulla), e ne abbiamo determinato l'effetto transdominante negativo sull'attività transattivante di Tat wild-type. A questo scopo cellule COS-1 erano co-trasfettate con ciascun vettore contenente un mutante di Tat ed il vettore pCV-Tat (nel rapporto molare di 10:1) in presenza del vettore HIV-1 LTR-CAT. Come si osserva in Tabella 2, i mutanti lys41 e tyr47 inibivano pressoché completamente l'attività di Tat, mentre i mutanti lys33 e cys22 inibivano parzialmente l'attività di Tat. Tuttavia, la proteina ricombinante cys22 (descritta nel successivo Esempio 3) era in grado di competere con la proteina Tat wild-type nel transattivare l'HIV-1 LTR-CAT (figura 1). Sono stati scelti un mutante nella regione cisteinica (cys22), uno nella regione core (lys41), uno nel secondo esone di Tat deleta della sequenza RGD (RGDΔ) ed un doppio mutante contenente la mutazione nella lys41 e la delezione della sequenza RGD (lys41-RGDΔ).

La sequenza dell'inserto tat e dei mutanti selezionati per la vaccinazione e' riportata qui di seguito. E' descritta una serie di mutanti nel gene tat che sono stati preparati per 1) sostituzione di una base per dar luogo ad una sostituzione aminoacidica e 2) delezione di una sequenza di basi per dar luogo ad una delezione dei corrispondenti aminoacidi. Le sostituzioni e delezioni delle basi sono state ottenute per mutagenesi sito-diretta. Le sequenze del gene tat wild-type e dei mutanti del gene tat, riportate qui di seguito sono state inserite nel vettore plasmidico pCV0 come descritto in precedenza.

Per Seq. 1 si intende la sequenza del gene tat di HIV-1, clone BH-10 e della sua proteina derivata. Per Seq. 2 si intende la sequenza del mutante cys22 (e della sua proteina derivata), rappresentata da una sostituzione del nucleotide Timina (T) in posizione 66 a partire dall'estremità 5' con il nucleotide Guanina (G). Tale sostituzione dà luogo ad una sostituzione, nella sequenza aminoacidica derivata, di una Cisteina (C in codice ad una lettera) in posizione 22 dall'estremità amino-terminale, con una Glicina (G in codice ad una lettera).

Per Seq. 3 si intende la sequenza del mutante lys41 (e della sua proteina derivata), rappresentata da una sostituzione del nucleotide Timina (T) in posizione 123 a partire dall'estremità 5' con il nucleotide Citosina (C). Tale sostituzione dà luogo ad una sostituzione, nella sequenza aminoacidica derivata, di una Lisina (K in codice ad una lettera) in posizione 41 dall'estremità amino-terminale, con una Treonina (T in codice ad una lettera). Per Seq. 4 si intende la sequenza del mutante RGD (e della sua proteina derivata), rappresentata dalla delezione della sequenza nucleotidica CGAGGGGAC, che va dal nucleotide 232 al nucleotide 240, a partire dall'estremità 5' della sequenza del gene tat wild-type. Tale delezione origina, nella sequenza aminoacidica derivata, una delezione degli aminoacidi Arginina-Glicina-Acido aspartico (RGD nel codice ad una lettera) nelle posizioni 78-80 a partire dall'estremità amino-terminale. Per Seq. 5 si intende la sequenza del doppio mutante lys41-RGDΔ (e della sua proteina derivata), un originato dalla combinazione dei mutanti sopradescritti.

Sequenza nucleotidica di tat wild-type (Seq. 1)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAAGTCTGTACCAATTGC
TATTGTAAAAAGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG
CGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAAT
CCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNICYCKKCCFHCQVCFTKALGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSL
SKQPTSQSRGDP TGPKE-COOH

Sequenza nucleotidica del mutante cys22 (Seq. 2)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAAGTCTGTACCAATTGCT
ATTGTAAAAAGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG
GGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAAT
CCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTAGTNCYCKKCCFHCQVCFTKALGISYGRKKRRQRRR
PPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDP TGPKE-COOH

Sequenza nucleotidica lys41 (Seq. 3)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAAGTCTGTACCAATTGC
TATTGTAAAAAGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG
CGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAAT
CCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNICYCKKCCFHCQVCFTTALGISYGRKKRRQRRR
PPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDP TGPKE-COOH

Sequenza nucleotidica del mutante RGDΔ (Seq. 4)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAAGTCTGTACCAATTGC
TATTGTAAAAAGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG
CGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAAT
CCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNICYCKKCCFHCQVCFTTALGISYGRKKRRQRRR
RPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSP TGPKE-COOH

Sequenza nucleotidica del mutante lys41-RGDΔ (Seq. 5)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTAAAAGTCTGTACCAATTGC
TATTGTAAAAAGTGTGCTTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAG
CGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAAT
CCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza aminoacidica

NH2-MEPVDPRLPEWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFTTALGISYGRKKRRQR
RPPQGSQTHQVLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

NOTA BARTOLO LUIGI
2000

Esempio 3. Costruzione e caratterizzazione degli immunogeni a DNA.

Le molecole di DNA per l'inoculazione degli animali sono costruite nel vettore plasmidico pCV0 di 6.4 kb [Arya et al., Science 229:69 (1985)]. Questo plasmide comprende due origini di replicazione di SV40, il "major late promoter dell'adenovirus" (AdMLP), e le sequenze di splicing dell'adenovirus e dei geni delle immunoglobuline di topo, il cDNA del gene della diidrossilato-redutasi di topo (dhfr) e il segnale di poliadenilazione di SV40. Il sito per l'enzima di restrizione PstI è localizzato a 3' dell'AdMLP, rappresenta il sito in cui è clonato il gene esogeno di interesse. Il cDNA del gene *tat* (261 coppie di basi) (Seq. 1, esempio 2) di HIV era derivato dal ceppo BH10 [Ratner et al., Nature 313:277 (1985)] e codifica per una proteina di 86 aminoacidi. Il vettore pCV-Tat [Arya et al., Science 229:69 (1985)] era ottenuto clonando il sito PstI di pCV0 il cDNA del gene *tat*, che pertanto era posto sotto il controllo trascrizionale dell'AdMLP. La scelta di questo vettore si basa sul fatto che l'AdMLP induceva una più elevata espressione di Tat, rispetto ad altri promotori eucariotici, come, per esempio, "l'immediate early region promoter" del citomegalovirus (CMV) come dimostrato da Ensoli et al. [J. Virol. 67:277 (1993)], e riportato nella Tabella 3.

TABELLA 3.

Espressione, localizzazione subcellulare, rilascio ed attività di Tat in cellule COS-1 transfettate con pCV-Tat e CMV-Tat.

Vettori	Espressione di Tat			Contenuto di Tat ^b			Attività di Tat	
	Nucleo ^c	Citoplasma ^c		Totale	Intracell.	Extracell.	Intracell. ^d	Extracell. ^e
Positive	(%)				(%)	(%)	(fold)	(cpm)
pCV-Tat	5-10	++	++	25	63.5	36.5	50	2,478
CMV-Tat	3-5	++	+	14.6	92.2	7.8	72	2,254
Controllo	0	-	-	0	0	0	1	1,400

^aCellule COS-1 (5×10^6) sono state transfettate mediante elettroporazione con 30 µg di pCV-Tat, CMV-Tat o un DNA di controllo. Quarantotto ore dopo la trasfezione, l'espressione di Tat è stata valutata mediante immunocistochimica con anticorpi monoclonali anti-Tat (i risultati sono riportati come media dei valori della percentuale delle cellule positive) e determinando la localizzazione di Tat nucleare e citoplasmatica. La presenza di Tat intra- ed extra-cellulare è stata analizzata mediante radioimmunoprecipitazione sugli estratti cellulari (500 µl) e nei terreni di cultura (4 ml) e successiva lettura densitometrica (Gelscan XL; Pharmacia) delle bande di Tat precipitate. L'attività del Tat intracellulare è stata misurata su estratti cellulari di cellule COS-1 cotransfettate con i vettori esprimenti Tat, o il vettore di controllo, ed il plasmide HIV-1 LTR-CAT; l'attività del Tat extracellulare sull'induzione della proliferazione di cellule AIDS-KS (determinata mediante saggio di incorporazione della timidina triziata) è stata misurata nel terreno di cultura (diluente 1:2 e 1:4) delle cellule transfettate con i plasmidi esprimenti Tat o il plasmide di controllo. I risultati corrispondono alla media di 5 esperimenti indipendenti.

^bAnalisi densitometrica della banda della proteina Tat immunoprecipitata. I valori sono espressi in una scala arbitraria, essendo 10 il valore minimo totale (Tat intra- ed extracellulare) evidenziato.

^c-, negativo; +, 50% di cellule Tat-positive; ++, 50-100% di cellule Tat-positive.

^dAttività CAT dopo 20 minuti di incubazione rispetto al vettore di controllo, il cui valore di attivazione è considerato uguale a 1.

^eLa crescita delle cellule AIDS-KS è stata misurata mediante un saggio di incorporazione di timidina triziata (deviazione standard, DS: 12%). Il terreno delle cellule transfettate con il DNA di controllo determinava un'incorporazione di timidina triziata pari a 1,400 cpm (DS: 11.5%). Il terreno di cultura derivato da linfociti contenenti il virus HTLV-II (controllo positivo) determinava un'incorporazione di timidina triziata pari a 2,400 cpm (DS: 10%).

Dai risultati della Tabella 3 si osserva che nelle cellule transfettate con pCV-Tat, rispetto alle cellule transfettate con CMV-Tat, la percentuale di cellule Tat-positive ed il contenuto totale di Tat è maggiore, la

quantità di Tat rilasciata è molto più elevata e correla con il contenuto totale e citoplasmatico di Tat, e l'attività biologica di Tat extracellulare sulla crescita delle cellule AIDS-KS è conseguentemente maggiore. Questi risultati indicano che il vettore pCV-Tat codifica per una proteina biologicamente attiva, induce alti livelli di espressione del cDNA del gene *tat* ed è in grado di rilasciare dalle cellule quantità di Tat molto maggiori rispetto al vettore CMV-Tat.

Il vettore pCV0 è utilizzato anche per l'espressione dei geni *nef*, *rev* e *gag* di HIV-1 e dei geni codificanti per le citochine IL-12 ed IL-15. I cDNA dei geni *nef* (618 coppie di basi, ceppo NL43) [Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos, NH (1995)] e *rev* (348 coppie di basi, ceppo NL43) [Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos, NH (1995)], il gene *gag* (1500 coppie di basi, ceppo NL43) [Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos, NH (1995)], o i cDNA dei geni IL-12 [Wolf et al., J. Immunol. 146:3074 (1991)] o IL-15 [Grabstein et al., Science 264:965 (1994)] sono amplificati mediante la tecnica della "polimerase chain reaction" (PCR) utilizzando primers specifici complementari ai primi 15 nucleotidi della regione 5' (primer forward) (Seq. P1, P3, P5, P7, P9) o agli ultimi 15 nucleotidi della regione 3' del gene (primer reverse) (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). Inoltre, ciascun primer, sia forward che reverse, include la sequenza per l'enzima di restrizione PstI in modo da consentire la clonazione dell'amplificato nel vettore pCV0. Dopo la clonazione si controlla la sequenza dei geni inseriti mediante sequenziamento del DNA. Il vettore pCV0 è utilizzato anche per la co-espressione di Tat con altri geni virali di HIV-1 (*rev*, *nef* o *gag*) o con i geni delle citochine IL-12 o IL-15. A questo scopo il cDNA del gene *tat* di HIV-1 di 261 coppie di basi (Seq. 1, esempio 2) è amplificato mediante PCR con un primer forward che include la sequenza per l'enzima di restrizione PstI (Seq. P11) e un primer reverse complementare agli ultimi 15 nucleotidi del gene *tat* (Seq. P12). I geni virali (*nef*, *rev* o *gag*) o i geni delle citochine IL-12 o IL-15 sono amplificati con un primer forward che include inoltre una sequenza di 15 basi complementare alla regione 3' del gene *tat*, tale da permettere che il gene sia "in frame" con il gene *tat* (Seq. P13, P14, P15, P16, P17), ed un primer reverse che include la sequenza per l'enzima di restrizione PstI (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). Successivamente si esegue una terza reazione di PCR in cui il DNA template è rappresentato dagli amplificati del gene *tat* e del gene di interesse, il primer forward è rappresentato dal primer utilizzato per amplificare *tat* (Seq. P11) e il primer reverse da quello utilizzato per amplificare il gene di interesse (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). L'amplificato *tat*/gene di interesse è purificato in gel di agarosio, digerito con PstI e clonato in pCV0. Dopo la clonazione si controlla la sequenza dei geni inseriti mediante sequenziamento del DNA, mentre l'espressione della proteina si determina mediante trasfezione come descritto in precedenza (Ensoli et al. J. Virol. 67: 2771993).

Sono riportate le sequenze dei primers sopra menzionati.

Seq. P1. Primer forward Rev: 5'ATGGCAGGAAGAAGC3'

Seq. P2. Primer reverse Rev: 5'CTATTCTTTAGTTCC3'

Seq. P3. Primer forward Nef: 5'ATGGGTGGCAAGTGG3'

Seq. P4. Primer reverse Nef: 5'TCAGCAGTCCTTGTA3'

Seq. P5. Primer forward Gag: 5'ATGGGTGCGAGAGCG3'

Seq. P6. Primer reverse Gag: 5'TTATTGTGACGAGGG3'

Seq. P7. Primer forward IL-12: 5'ATGTGGCCCCCTGGG3'

Seq. P8. Primer reverse IL-12: 5'TTAGGAAGCATTTCAG3'

Seq. P9. Primer forward IL-15: 5'ATGAGAATTTTCGAAA3'

Seq. P10. Primer reverse IL-15: 5'TCAAGAAGTGTTGAT3'

Seq. P11. Primer forward Tat: 5'ATGGAGCCAGTAGAT3'

Seq. P12. Primer reverse Tat: 5'CTATTCTTTCGGGCC3'

Seq. P13. Primer forward Tat/Rev: 5'GGCCCGAAGGAAATGGCAGGAAGAAGC3'

Seq. P14. Primer forward Tat/Nef: 5'GGCCCGAAGGAAATGGGTGGCAAGTGG3'

Seq. P15. Primer forward Tat/Gag: 5'GGCCCGAAGGAAATGGGTGCGAGAGCG3'

Seq. P16. Primer forward Tat/IL-12: 5'GGCCCGAAGGAAATGTGGCCCCCTGGG3'

Seq. P17. Primer forward Tat/IL-15: 5'GGCCCGAAGGAAATGAGAATTTTCGAAA3'

Esempio 4. Inoculazione in *Macaca fascicularis* sani di un vaccino anti-Tat proteico: valutazione della sicurezza, tollerabilità, risposta immune specifica.

La tollerabilità, la sicurezza e la capacità di indurre una risposta immune specifica (umorale e cellulare) della proteina Tat ricombinante prodotta con il metodo descritto e purificata tramite colonne di affinità di eparina è stata valutata nel modello sperimentale dei primati non umani delle scimmie cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Per attivare un'ampia risposta immune con un vaccino proteico abbiamo usato l'idrossido di alluminio (Alum) che è stato sperimentato in numerosi modelli ed è l'unico approvato per la sperimentazione nell'uomo. Tra gli adiuvanti particolari abbiamo usato il RIBI (appartenente al gruppo degli emulsionanti e composto da lipide A monofosforilico, dimicolato trealosico e scheletro della parete batterica del bacillo di Calmette-Guerin) [Audibert et al., Immunol. Today 14:281 (1993); Morein et al., AIDS Res. Hum. Retrov. S10:S109 (1994)].

Nel primo esperimento pilota abbiamo inoculato 3 scimmie secondo il seguente schema:

1) Proteina Tat ricombinante (100 µg), risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI, ed inoculata per via sottocutanea in un sito. 2) Proteina Tat ricombinante (10 µg), risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI, ed inoculata per via sottocutanea in un sito. 3) Scimmia di controllo non inoculata. Da tutte le scimmie erano prelevati 10 ml di sangue nei giorni -42 e -35 antecedenti la prima vaccinazione per la determinazione dei parametri di base. Campioni di sieri e di plasma sono stati congelati a -20° o -80°C ed utilizzati successivamente per risospesare l'inoculo proteico. Le scimmie 1 e 2 erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 5, 10, 15, 22 e 27 settimane. Negli stessi giorni dell'inoculazione dell'immunogeno venivano prelevati campioni di 10 ml di sangue per eseguire gli esami di laboratorio (analisi chimico-cliniche, elettroliti, conta dei leucociti, delle piastrine, dell'emoglobina), la valutazione di parametri immunologici, quali la presenza di immunoglobuline specifiche (IgM, IgG, IgA) i livelli di citochine del tipo Th1 (IL-2, IFN γ) e Th2 (IL-4, IL-10), IL-15, la produzione di chemochine (Rantes, MIP-1 e MIP-1), il fenotipo linfocitario (CD4, CD8, CD3, CD14, CD20, CD25, CD56 e HLA-DR, CD45RA e CD45RO), la risposta proliferativa a Tat, la presenza di attività CTL e NK, e la presenza di attività antivirale mediata dalle cellule CD8⁺ (CAF). Inoltre, per valutare *in vivo* la presenza di una risposta cellulo-mediata, tutte le scimmie vaccinate e quella di controllo erano sottoposte a "skin-test" per Tat. Questo esperimento pilota prevede un ulteriore richiamo di tutte le scimmie alla 32^a settimana ed infine un richiamo con la proteina Tat risospesa in Iscom (immune stimulating complex). L'Iscom è un adiuvante composto dalla saponina Quil A, colesterolo e fosfolipidi in grado di incrementare la risposta umorale e cellulare [Morein et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 10:S109 (1994); Lövgren et al., Vaccine 14:753 (1996)]. L'effetto protettivo della vaccinazione sarà quindi determinato dopo il "challenge" delle scimmie vaccinate e di controllo, che sarà effettuato alla 41^a settimana dall'inizio della immunizzazione, inoculando per via endovenosa 10 MID₅₀ (50% monkey infectious doses) di "simian-human immunodeficiency virus" (SHIV) cresciuto e titolato in *Macaca fascicularis* e contenente il gene *tat* ed il gene *nef* e *rev* di HIV [Shibata et al., J. Virol. 65:314 (1991); Li et al., J. AIDS 5:639 (1992); Sakuragi et al., J. Gen. Virol. 73:2983 (1992); Li et al., J. AIDS 5:639 (1992); Igarashi et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 10:1021 (1994); Luciw et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92:7490 (1995); Reinmann et al., J. Virol. 31: 98 (1996)]. Il monitoraggio post-challenge (ogni 2 settimane a partire dal giorno del challenge per il primo mese, ogni 4 settimane per i successivi 3 mesi, ed ogni 8 settimane fino a 6 mesi dal challenge) includerà anche l'analisi di parametri virologici quali la determinazione dei valori plasmatici di p27 ed il carico virale nel plasma e nelle cellule. I risultati di questo esperimento relativi alle prime 27 settimane dall'inizio del protocollo sono i seguenti. Nelle scimmie vaccinate e nel controllo non si erano osservate alterazioni significative dei parametri chimico-fisici, ematologici e comportamentali. Non erano osservati segni di infiammazione e neoformazioni vascolari nei siti di inoculazione. Questi risultati indicano che la proteina Tat era ben tollerata dagli animali e non era tossica nelle dosi somministrate, utilizzando le vie di inoculazioni scelte. Nelle scimmie 1 e 2 erano presenti anticorpi IgG specifici anti-Tat a partire dalla 5^a settimana dopo la prima inoculazione. Alla 27^a settimana IgG anti-Tat erano evidenziabili alla diluizione di 1:3200 e 1:6400 nel plasma della scimmia 1 e 2 rispettivamente. I risultati sono riportati nelle figure 2 e 3. I risultati attualmente disponibili dimostrano la comparsa di una risposta proliferativa al Tat alla 22^a settimana (Tabella 4) nelle scimmie inoculate con il Tat, essendo maggiore nella scimmia 2 che riceveva ad ogni inoculazione 10 µg di proteina Tat ricombinante.

TABELLA 4

Risposta proliferativa al Tat alla 22^a settimana post-immunizzazione^a

N° scimmia	Stimolo	Indice di stimolazione
1	PHA	13,95
	TT	4,68
	Tat	2,45
2	PHA	11,57
	TT	3,77
	Tat	3,04
3	PHA	19,9
	TT	6,23
	Tat	1,38

^aLinfociti di sangue periferico isolati mediante gradiente di Ficoll e seminati a 2×10^5 cellule per pozzetto in triplicato in piastre da 96 pozzetti, erano cresciute in RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino e inoculate con Tat (5 µg/ml), PHA (4 µg/ml), o tossoide del tetano (TT) (10 µg/ml), contro cui tutti le scimmie erano vaccinate. Campioni di controllo erano incubati solo con il terreno di crescita. L'incremento della proliferazione cellulare era determinata al 5° giorno con saggio di incorporazione di timidina triziata come descritto [Ensolì et al., IV International Conference on AIDS, Stockholm, 1:241 (1988); Cafaro et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 7:204 (1991)]. I risultati sono riportati come indice di stimolazione (che era calcolato secondo la seguente formula: Media dei cpm del campione/media dei cpm dei controlli. Sono considerati positivi i valori superiori a 2). Le scimmie 1 e 2 erano inoculate con la proteina Tat ricombinante (100 µg o 10 µg, rispettivamente) risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI, ed inocolata per via sottocutanea in un sito. La scimmia 3 è una scimmia di controllo non inocolata.

I risultati di questo esperimento pilota indicano che la proteina Tat ricombinante, prodotta e purificata con il protocollo da noi descritto, non era tossica alle dosi di 100 e 10 µg inoculate per via sottocutanea ed era in grado di indurre una risposta immune specifica sia umorale che cellulo-mediata. La risposta immune specifica anti-Tat era maggiore nella scimmia 2, immunizzata con 10 µg di proteina ricombinante. Inoltre, anche l'adiuvante RIBI non era apparentemente tossico negli animali.

Un esperimento iniziato successivamente abbiamo valutato l'effetto dell'immunizzazione indotta da Tat in combinazione con il RIBI o con l'Alum. Le scimmie sono state inoculate per via sottocutanea in un unico sito secondo il seguente schema. Scimmie 1-3 : 10 µg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI. Scimmie 4-6: 10 µg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di Alum. Scimmia 7: RIBI 250 µl e 250 µl di siero autologo. Scimmia 8: Alum 250 µl e 250 µl di siero autologo. Da tutte le scimmie sono stati prelevati 10 ml di sangue al giorno -9, antecedente la prima vaccinazione, per potere eseguire le analisi descritte nel primo esperimento pilota e disporre dei parametri di base di ciascun animale. Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 6, 11 e 15 settimane. Negli stessi giorni dell'inoculazione dell'immunogeno venivano prelevati campioni di 10 ml di sangue per eseguire gli esami descritti nel primo esperimento pilota. Inoltre, sono prelevati campioni di urine ed eseguiti tamponi vaginali sui quali sarà determinata la presenza di IgA secretorie specifiche. Questo esperimento pilota prevede due richiami alla 21^a e 26^a settimana delle scimmie 1-6 con l'immunogeno proteico ed adiuvanti e delle scimmie 7 e 8 con solo gli adiuvanti. Infine, verrà eseguito un ultimo richiamo alla 31^a settimana con la proteina Tat risospesa in Iscom. L'effetto protettivo della vaccinazione sarà quindi determinato dopo il challenge delle scimmie, vaccinate e di controllo, che sarà effettuato alla 40^a settimana dall'inizio dell'immunizzazione, inoculando per via endovenosa 10 MID₅₀ di SHIV. Il monitoraggio post-challenge verrà eseguito come descritto per il primo esperimento pilota.

I risultati del secondo esperimento pilota, attualmente disponibili e relativi alla 15^a settimana dall'inizio della vaccinazione, sono i seguenti. Negli animali non si osservavano alterazioni significative dei parametri chimico-fisici, ematologici e comportamentali. Le scimmie non presentavano infiammazione o segni di neovascolarizzazione nei siti di inoculazione. E' stata dimostrata la presenza di una risposta anticorpale (IgM, IgG) specifica. Alla 15^a settimana i titoli anticorpali (IgG) anti-Tat raggiungevano valori elevati e variabili da 1:12.800 a titoli maggiori di 1:50.000 (figure 4-6). Inoltre l'attività neutralizzante il Tat del siero delle scimmie vaccinate veniva saggiata mediante saggi di inibizione del "rescue" dell'infezione virale in cellule HLM-1 trattate con la proteina Tat esogena, come precedentemente descritto [Ensoli et al., J. Virol. (1993)]. Tali saggi hanno dimostrato che i sieri delle scimmie M1-6 diluiti 1:2 ottenuto alla 15^a settimana dal primo inoculo erano in grado di bloccare la replicazione virale indotta da Tat esogeno, misurata tramite determinazione dell'antigene p24 nel soprannatante delle cellule, mentre il siero delle stesse scimmie al tempo 0 (preimmune) o i controlli negativi non avevano attività bloccante verso il Tat (Tabella 5).

TABELLA 5

Attività neutralizzante degli anticorpi anti-Tat sul "rescue" dell'infezione virale indotta da Tat extracellulare.

Campioni	HIV-1p24 (pg/ml)
Tat	61.88
Tat + Siero preimmune M1	46.80
Tat + Siero preimmune M2	22.96
Tat + Siero preimmune M3	96.98
Tat + Siero preimmune M4	126.68
Tat + Siero preimmune M5	27.03
Tat + Siero preimmune M6	78.61
Tat + Siero immune M1	4.77
Tat + Siero immune M2	4.88
Tat + Siero immune M3	Neg.
Tat + Siero immune M4	Neg.
Tat + Siero immune M5	7.88
Tat + Siero immune M6	4.55
Pool M1-6 (controllo preimmune)	Neg.
Pool M1-6 (controllo immune)	Neg.
PBS - 0.1% BSA	Neg.



L'attività neutralizzante degli anticorpi anti-Tat è stata determinata in cellule HLM-1 (cellule HeLa contenenti integrata una copia del provirus HIV-1 difettivo del gene tat). Cellule HLM-1 sono state piastrate a concentrazione di 6×10^5 pozzetto in piastre da 24 pozzetti ed incubate a 37°C per 16 ore. Le cellule sono state lavate 2 volte con PBS contenente albumina sierica bovina (BSA) allo 0.1%, ed incubate per 48 ore con terreno di crescita (0.3 ml) a cui veniva aggiunta la proteina Tat ricombinante (30 ng/ml) da sola o in presenza di un ugual volume di siero (diluito 1:2) delle scimmie prelevati al tempo 0 (sieri preimmuni) o alla 15^a settimana (sieri immuni). I controlli erano rappresentati dalle cellule trattate solo con un pool dei sieri preimmuni, immuni, o con PBS contenente BSA allo 0.1% (PBS + 0.1% BSA) ma in assenza di Tat. Ogni campione è stato saggiato in doppio. Sui supernatanti cellulari era quindi determinata la presenza di virus rilasciato dalle cellule mediante determinazione dei valori di antigene p24, utilizzando un kit commerciale p24 antigene capture - Elisa (Nen Dupont). I risultati sono espressi come valori di p24 (pg/ml) presenti nei terreni e corrispondono alla media dei valori ottenuti dai due pozzetti per ciascun campione.

Alla 11^a settimana era inoltre evidente una risposta proliferativa specifica al Tat nelle scimmie 2 e 3 inoculate con la proteina Tat ed il RIBI e nella scimmia 4 inoculata con la proteina Tat e l'Alum che aumentava alla 15^a settimana (Tabella 6).

TABELLA 6.

Risposta proliferativa al Tat^a

N° scimmia	Stimolo	Settimane dell'inizio della immunizzazione			
		0	6	11	15
1	PHA	16,96	22,83	10,50	15,27
	TT	11,69	2,16	1,96	3,01
	Tat	1,12	1,94	1,55	0,52
2	PHA	31,27	29,37	25,75	21,28
	TT	1,12	2,16	1,8	0,57
	Tat	1,08	2,05	3,65	6,22
3	PHA	22,42	39,15	7,89	16,88
	TT	11,43	1,72	0,95	1,71
	Tat	1,65	1,44	2,69	18,82
4	PHA	3,88	13,85	20,77	15,22
	TT	2,85	3,90	4,49	9,07
	Tat	1,29	1,88	3,01	3,24
5	PHA	6,50	11,39	5,74	16,74
	TT	2,31	3,22	1,07	4,84
	Tat	1,80	1,02	0,66	1,76
6	PHA	11,96	7,01	17,94	2,77
	TT	4,14	5,01	1,71	0,13
	Tat	1,37	2,47	1,06	0,11
7	PHA	21,65	25,20	20,30	37,93
	TT	0,97	1,30	0,80	0,88
	Tat	1,78	1,12	0,68	0,73
8	PHA	26,51	21,44	67,09	16,38
	TT	1,20	2,03	10,78	0,20
	Tat	1,12	0,97	0,00	0,21

^aLinfociti di sangue periferico isolati, piastrati e cresciuti come descritto, venivano stimolati con PHA (4 µg/ml), il tossoide tetanico (TT) e Tat (5 o 1 µg/ml) e saggiati, come descritto in Tabella 4. Le scimmie 1-3 erano inoculate con 10 µg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI; 3 scimmie 4-6 erano inoculate oppure con 10 µg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di Alum; due scimmie di controllo venivano inoculate con RIBI (250 µl e 250 µl di siero autologo) (scimmia 7) e con Alum (250 µl e 250 µl di siero autologo) (scimmia 8).

Inoltre, alla 15^a settimana 5 scimmie inoculate con la proteina ricombinante (scimmie 2-6) reagivano allo skin test, ulteriormente indicando la presenza di una risposta cellulo-mediata evidenziata da una forte reazione di ipersensibilità ritardata (Tabella 7 e figura 7).

TABELLA 7.
Skin-test al Tat^a

N° scimmie	Settimane dall'inizio dell'immunizzazione	
	11	15
1	-	-
2	-	+
3	-	+
4	-	+
5	+	+
6	-	+
7	ND	ND
8	ND	ND

^aTat (5, 1 e 0.2 µg) in 150 µl di PBS-0.1% BSA od il suo tampone ventvano inoculati per via intradermica in un'area tricotomizzata del dorso degli animali vaccinati ma non nei controlli (ND, non determinato) all'11^a ed alla 15^a settimana dopo il primo inoculo vaccinale. La comparsa di eritema dopo 24, 48 o 72 ore veniva considerata come risposta positiva.

Questi risultati indicano che l'immunogeno, nonché entrambi gli adiuvanti RIBI e alum, erano ben tollerati dagli animali e non erano tossici, confermando i risultati relativi alla sicurezza e tollerabilità della vaccinazione con Tat ottenuti nel primo esperimento pilota. Inoltre, questi dati confermano l'osservazione riportata nel primo esperimento ovvero che la proteina ricombinante Tat induce una forte risposta umorale e cellulare specifica anti-Tat in vitro e in vivo.

Esempio 5. La costimolazione con biglie anti-CD3/28 di linfociti CD4+ purificati da scimmie infette con SIV+ induce l'espansione logaritmica del numero delle cellule in assenza di significativa replicazione e propagazione del virus.

Le cellule del sangue periferico sono state deplete della sottopopolazione CD8+ mediante l'impiego di biglie paramagnetiche anti-CD8 (Dynal, Oslo; Dynabeads M-450 CD8) e la purezza delle popolazioni ottenute è stata valutata tramite l'analisi citofluorimetrica e considerata accettabile se maggiore del 95%. Le cellule CD8 deplete (denominate CD8⁻PBMC) sono state messe in coltura e stimulate con PHA (2µg/ml) e IL-2 (40 U/ml) o con biglie paramagnetiche previamente coniugate con due anticorpi monoclonali specifici per gli antigeni CD3 (Clone FN18, Biosource) e CD28 (Clone 9.3, omaggio del Dr. Carl June) (biglie anti-CD3/28). Allo scopo di facilitare il legame con le biglie anti-CD3/28 l'incubazione è avvenuta su un dispositivo rotante e le cellule coniugate, selezionate con l'ausilio di un magnete, sono state denominate CD8-CD3+CD28+ e poste in coltura. La concentrazione delle cellule è stata riportata a quella di partenza 3 volte a settimana ed è stata aggiunta IL-2 ove indicato: inoltre per quanto riguarda le cellule stimulate con biglie anti-CD3/28, esperimenti preliminari hanno dimostrato la convenienza dell'utilizzo di un regime di stimolazione continua ripristinando il rapporto ottimale biglie:cellule ad ogni conta eseguita. Nostri studi hanno infatti dimostrato che in assenza di IL-2 esogena la sottopopolazione CD8-CD3+CD28+ prolifera significativamente meglio delle cellule CD8⁻PBMC in risposta alla costimolazione con biglie anti-CD3/28 e che l'aggiunta di IL-2 (40 U/mL, 3 volte alla settimana) migliora significativamente la cinetica di proliferazione sia per durata che per numero di cellule ottenute (figura 8).

Allo scopo di valutare l'attività antivirale, cellule CD8-CD3+CD28+ purificate da 4 animali SIV⁻ sono stati infettati al giorno 0 con 0.1 M.O.I. di SIV e mantenute in condizioni di stimolazione continua; come controllo sono stati impiegati CD8⁻PBMC stimolati con PHA e IL-2. L'andamento dell'infezione è stato monitorato mediante determinazione dell'antigene virale p27gag nei sovrantanti delle colture utilizzando un kit ELISA commerciale (Coulter, Hialeah, FL). I livelli di p27 (ng/ml) misurati al giorno 6 e 12 post infezione e riportati in Figura 9 hanno indicato una netta differenza fra le due condizioni di stimolazione in termini di produttività dell'infezione. Infatti al giorno 6 la riduzione percentuale della p27 rispetto ai campioni stimolati con PHA e IL-2 era compresa fra il 40% e l'87% e al giorno 12 tale riduzione era incrementata in 2 soggetti su

4 suggerendo una minore permissività delle cellule all'infezione virale. In un solo caso (mk 9401), abbiamo registrato la propagazione dell'infezione anche nella condizione di stimolazione con biglie anti-CD3/28. I risultati descritti dimostrano che il *Macacus fascicularis* rappresenta un buon modello per la espansione ex vivo di sottopopolazioni linfocitarie in assenza di significativa replicazione virale mediante costimolazione con biglie anti-CD3/28 e costituisce il razionale per un vaccino terapeutico basato sulla espansione e reinfusione, in soggetti infetti con HIV, di linfociti autologhi specifici per gli antigeni virali proposti.

Esempio profetico 6. Inculazione in *Macaca fascicularis* di un vaccino anti-Tat a DNA.

E' proposta l'inoculazione diretta del DNA del plasmide pCV-Tat, contenente il cDNA del gene *tat* wild-type, e pCV0 come DNA di controllo. I DNA plasmidici da somministrare agli animali, sono amplificati in batteri E.Coli (ceppo DH5) secondo procedure standard [Molecular cloning - A Laboratory manual; Eds. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1992)] e secondo protocolli stabiliti dalla "European Agency for the evaluation of medicinal products: Human Medicine Evaluation Unit" (Technical Report Series No. 17 January 1997), purificati mediante due gradienti di CsCl e dializzati per 48-72 ore contro 100 volumi di PBS (senza Ca++ e Mg++) sterile. I DNA sono controllati mediante digestione con enzimi di restrizione, i cui siti di taglio sul DNA plasmidico sono noti, e la loro funzionalità controllata mediante transfezione di 5-10 µg di DNA con la tecnica del fosfato di calcio [Molecular cloning - A Laboratory Manual; Eds. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1992)] in cellule H3T1 (1 x 10⁶), che derivano da cellule HeLa contenenti integrato una copia del plasmide reporter HIV-1 LTR-CAT, e 48 ore dopo determinazione dell'attività dell'enzima CAT [Gorman et al. Mol. Cell. Biol. 2:1044 (1982)].

I DNA di pCV-Tat o di pCV0 (0.5-2 mg) risospesi in soluzione fisiologica saranno inoculati per via intramuscolare in due siti. 2-5 giorni prima della vaccinazione, gli animali verranno inoculati con 1 ml di soluzione fisiologica contenente lo 0.5% di bupivacaina e lo 0.1% di metilparabene nei due siti, opportunamente marcati, in cui successivamente verrà eseguita la vaccinazione, per aumentare l'uptake e l'espressione del DNA nel muscolo [Danko et al., Vaccine 12:1499 (1994); Fine et al., Ann. Plast. Surg. 20:6 (1988)]. Le scimmie saranno inoculate al tempo 0 e dopo 5, 10, 15, 22 e 27 settimane. Infine alla 32^a settimana sarà eseguito un richiamo con la proteina Tat ricombinante (10 µg) in presenza di Iscom. Gli animali saranno osservati giornalmente per quello che riguarda i parametri clinici come descritto nell'esempio 4. Inoltre si preleveranno campioni di 10 ml di sangue prima dell'inizio della immunizzazione e negli stessi giorni della inoculazione come descritto nell'esempio 4. L'effetto protettivo della vaccinazione sarà determinato dopo il "challenge" delle scimmie, che sarà attenuato alla 41^a settimana dall'inizio della immunizzazione, inoculando per via endovenosa 10 MID50 di SHIV. Il monitoraggio post-challenge sarà effettuato come descritto nell'esempio 4. Saranno valutati anche protocolli di immunizzazione in cui saranno usate combinazioni dei DNA esprimenti gli altri geni di HIV-1 e/o citochine, descritti nell'esempio 3.

I DNA di plasmidi pCV0 e pCVTat possono essere inoculati negli animali utilizzando altri sistemi di "delivery" che potrebbero rendere più efficace l'immunizzazione, quali l'uso di liposomi, nanoparticelle o "gene gun".

Esempio profetico 7. Uso delle cellule dendritiche

I precursori di cellule dendritiche saranno isolati dal sangue periferico di primati non umani appartenenti alla specie *Macaca fascicularis* mediante coltura in vitro di cellule aderenti con GM-CSF e IL-4 per 7-14 giorni. L'analisi morfologica e la caratterizzazione fenotipica (FACS analisi e immunostochimica dopo cytopspin) verranno condotte per confermare la identità delle cellule ottenute in coltura. L'analisi funzionale si baserà sulla capacità delle cellule isolate di indurre la proliferazione di linfociti allogenici, caratteristica distintiva delle cellule dendritiche.

Le cellule dendritiche risospese alla concentrazione di 1x10⁵/100 µl in RPMI 1640 contenente il 5% di siero autologo, 10 mM di Hepes buffer, 100 U/ml di penicillina-streptomina, 0.5 mg/ml di amfotericina B, e glutammmina allo 0.03% saranno incubate per 2 ore a 37°C in presenza di Tat o di suoi peptidi o delle combinazioni Tat, Rev, Nef, Gag e/o citochine e successivamente inoculate 2 o più volte a distanza di 2-4 settimane per via endovenosa. Alternativamente, le cellule dendritiche verranno trasdotte con vettori

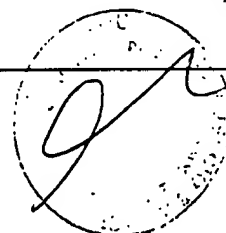
contenenti il gene tat da solo o associato con gli altri vettori summenzionati e successivamente inoculate endovena.

Esempio Profetico 8. Vaccinazione terapeutica

Per stabilire l'efficacia di una vaccinazione terapeutica anti-Tat, sia proteica che a DNA, verranno allestiti esperimenti in scimmie già infettate con SHIV in fase asintomatica e sintomatica. In particolare si valuterà la comparsa di alterazioni nel sito di inoculo e di sintomi generali nelle scimmie asintomatiche e di modificazioni della sintomatologia in animali già sintomatici. Benché remota, esiste infatti la possibilità che in scimmie infette l'inoculazione del Tat aumenti la replicazione virale. Tuttavia, questo effetto dovrebbe essere transitorio in considerazione sia della dose modesta di Tat inoculata, che della breve emivita della proteina transattivatrice (T1/2: 12 h). Nel caso ciò si dovesse verificare impiegheremo i mutanti del Tat (sotto forma di proteine, peptidi o di DNA), descritti nell'esempio 2. Alternativamente utilizzeremo in congiunzione con il vaccino, inibitori della replicazione virale. Per valutare gli effetti della vaccinazione sulla progressione della malattia, il monitoraggio dei parametri clinici, di laboratorio e viro-immunologici (descritti sopra) verrà effettuato al tempo zero, al momento della successiva somministrazione dell'immunogeno e 30 giorni dopo la stessa. Dopo l'ultima inoculazione il monitoraggio avverrà con frequenza mensile ed ogni qualvolta siano apparsi segni indicanti un repentino cambiamento del quadro clinico. Campioni di PBMC, siero, plasma ed urine verranno congelati ad ogni controllo per successive valutazioni come descritto in precedenza.

Esempio profetico 9. Stimolazione dell'immunità mucosale

Gli immunogeni descritti saranno utilizzati per indurre e/o potenziare una risposta immune specifica a livello delle mucose. Uno degli approcci che verrà utilizzato si basa sull'uso di batteri (*Streptococcus gordonii*, commensale della cavità orale dell'uomo) "ingegnerizzati" ad esprimere gli antigeni virali sopra menzionati. Questi batteri sono in grado di colonizzare la mucosa orale e vaginale nei topi, e di indurre una risposta anticorpale specifica locale e sistemica nei confronti degli antigeni eterologhi espressi sulla superficie dei batteri ricombinanti [Oggioni et al., *Vaccine* 13: 775 (1995); Medaglini et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6868 (1995); Medaglini et al., *Vaccine* 1997, in press]. L'inventore ritiene che questo metodo possa essere utilizzato con successo per indurre nelle scimmie *cynomolgus* l'immunizzazione specifica anche per via vaginale. Alternativamente l'immunità mucosale può essere indotta con gli immunogeni proteici descritti sopra, utilizzando altri sistemi di "delivery" batterici e non quali le citofectine ed i liposomi, e le vie di inoculazione che sono in grado di indurre la più efficace risposta immune e protettiva [Lewis et al., *Vaccine* Press. Ed. Robinson, Farrar, Woblin; Human Press. Totowa, New Jersey (1996); Lehnen et al., *Vaccine Research* 1:319 (1992); Honebng et al., *Infect. Immun.* 62:15 (1994)].



H 02.03.99

1354PTIT

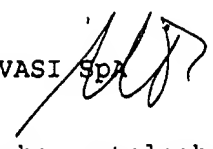
NOTARBARTOLO & GERVASI SPA

RM 97 A 000743

RIVENDICAZIONI

1. Vaccino contro l'AIDS, i tumori e le sindromi insorgenti nei soggetti infettati da HIV-1 comprendente proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta).
2. Vaccino secondo la riv. 1 in cui le proteine o i peptidi e mutanti sono combinati con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag.
3. Vaccino secondo la riv. 1 in cui le proteine o i peptidi e mutanti sono combinati con le citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15.
4. Vaccino a DNA contro l'AIDS, i tumori e le sindromi insorgenti nei soggetti infettati da HIV-1 comprendente molecole o frammenti di DNA codificanti per Tat wild-type o per i mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta), dette molecole o frammenti di DNA essendo inseriti nel vettore plasmidico pCV0.
5. Vaccino secondo la riv. 4 in cui le molecole o frammenti di DNA sono combinati con molecole o frammenti di DNA dei geni nef, rev e gag.
6. Vaccino secondo la riv. 4 in cui le molecole o frammenti di DNA sono combinati con molecole o frammenti di DNA delle citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15.
7. Impiego di proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta), o relative combinazioni con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag, o relative combinazioni con le citochine immunomodulatrici di

1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI SpA 

IL-12 e IL-15 per immunizzare cellule dendritiche autologhe indotte ad esprimere gli antigeni corrispondenti.

8. Impiego di proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta), o relative combinazioni con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag, o relative combinazioni con le citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15 per realizzare farmaci o vaccini per immunizzare cellule dendritiche autologhe trasdotte con vettori eucariotici contenenti dette proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e suoi mutanti e relative combinazioni.

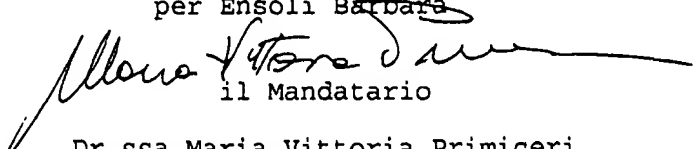
9. Impiego secondo le riv. 7 e 8 per realizzare farmaci o vaccini per immunizzazione a livello mucosale.

10. Impiego di proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta), o relative combinazioni con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag, o relative combinazioni con le citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15 per realizzare farmaci o vaccini per immunizzare cellule del sangue periferico tramite co-stimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28.

Roma,

/pv

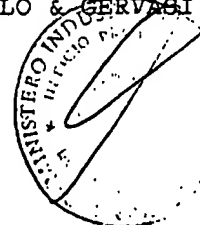
per Ensoli Barbara



il Mandatario

Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri

della NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.



NOTA BARTOLO & GERVASI S.p.A.

Ma e Vittorio

PM 97 A 0007 43

%Acetil. 0.3 75

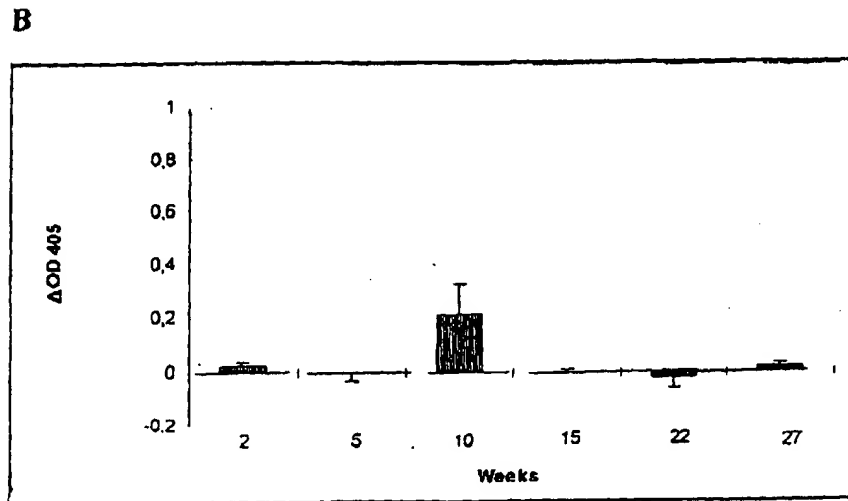
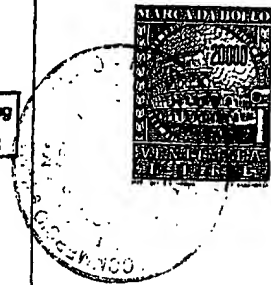
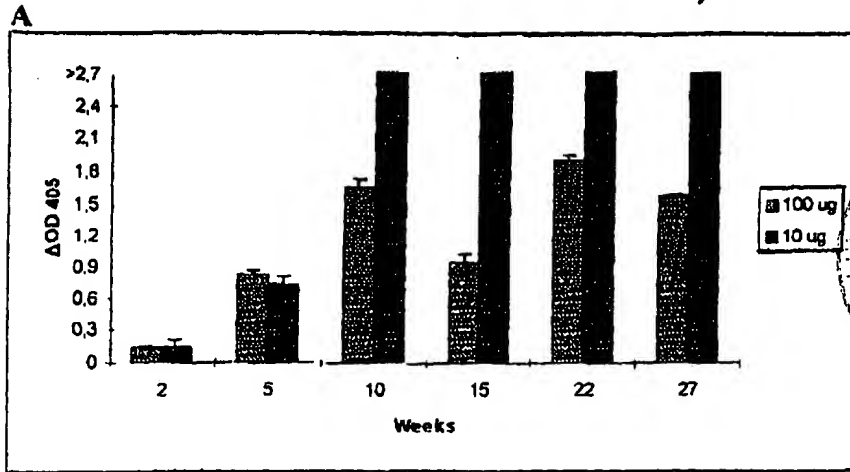
TAT
TAT22

+
+

+



Fig. 1



07 A 000743

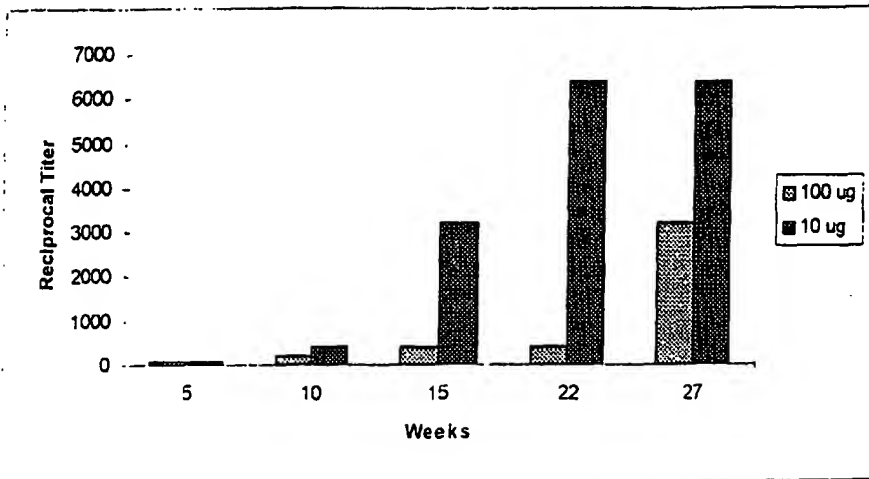
A circular stamp with the text "CASA DI RICERCA" and "CASA DI RICERCA" is visible. A signature is written across the stamp.

Fig. 2

H 02.03.99

NOTAR BARTOLO & GERVA S.p.A.

Mano Bartolo

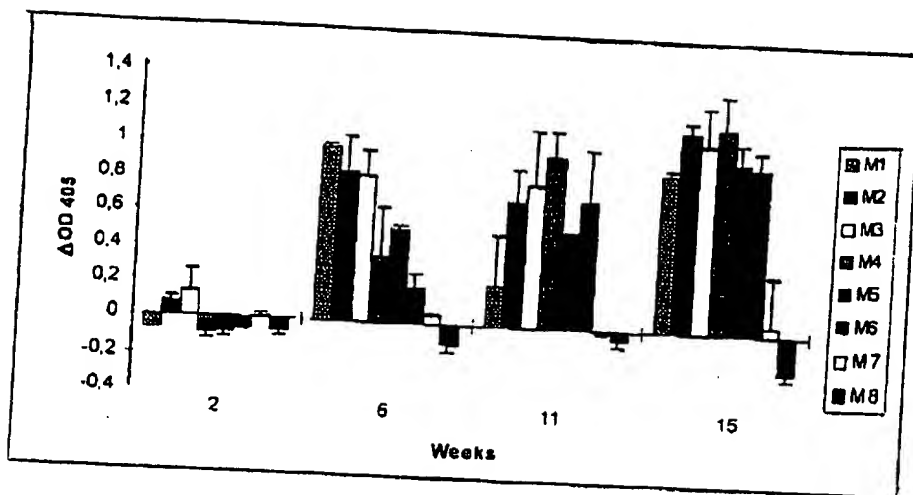


RM 97 A 000743



Fig. 3

Mane V. G. S. P.

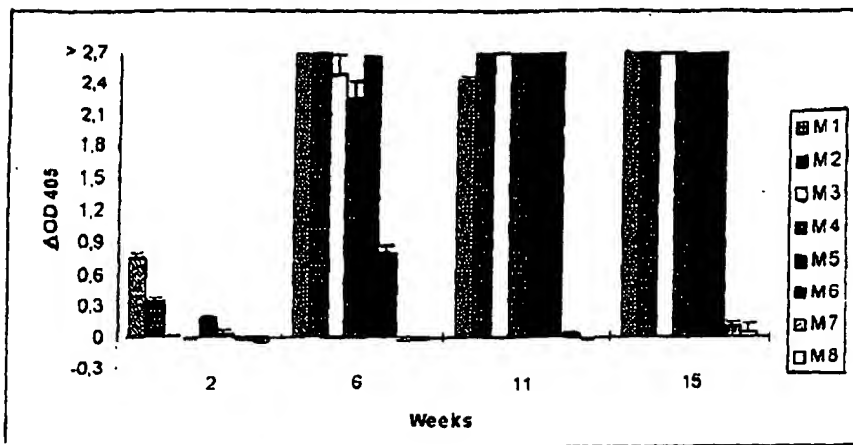


RM 97 A 000743



Fig. 4

W. BARTOLO & GERVASIO S. P.A.
W. Bartolo



RM 97 A 0007 43

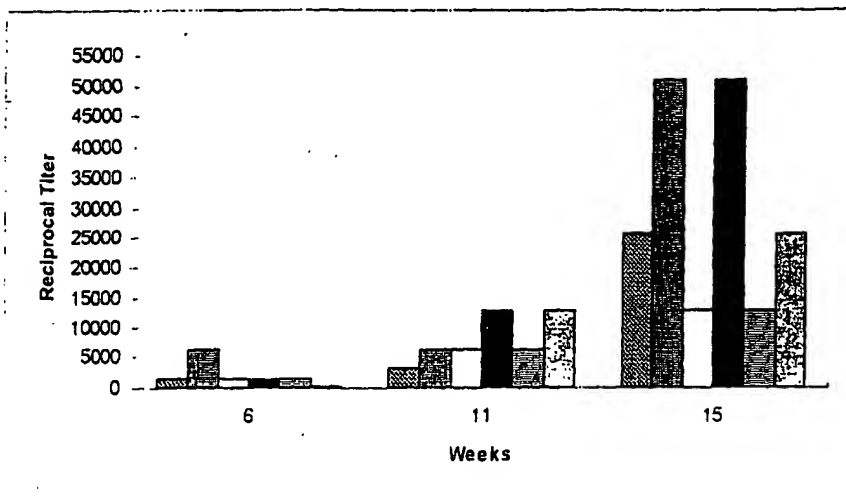


Fig. 5

H00000

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

Mane Vito



FM 97 A 000743



Fig. 6

H 00.00.00

NOTAR BARTOLO & GERVAISI S.p.A.

[Handwritten signature]

RM 97 A 000743



Fig. 2

H 00:00:00

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

PM 97 A 000743

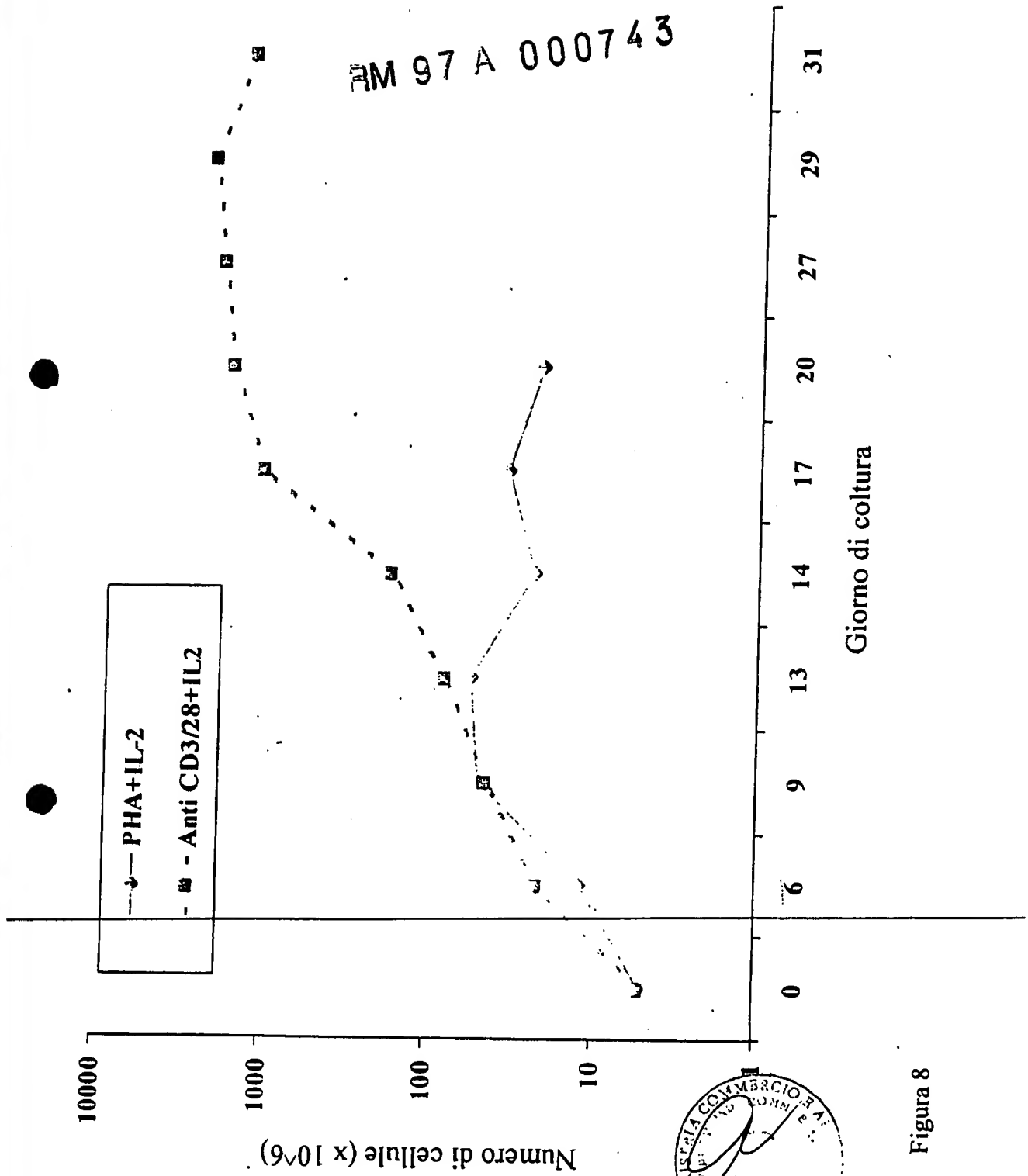
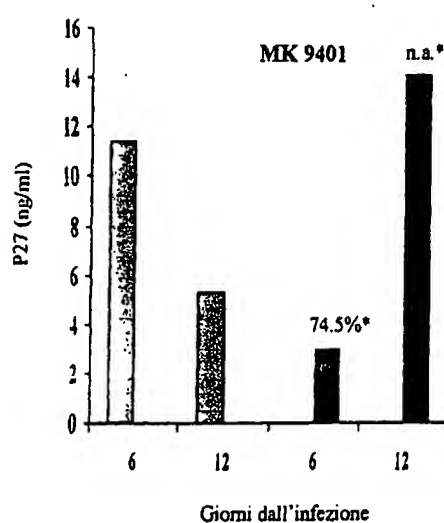
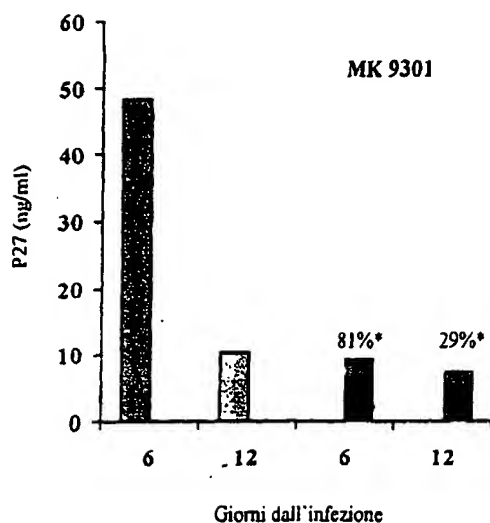
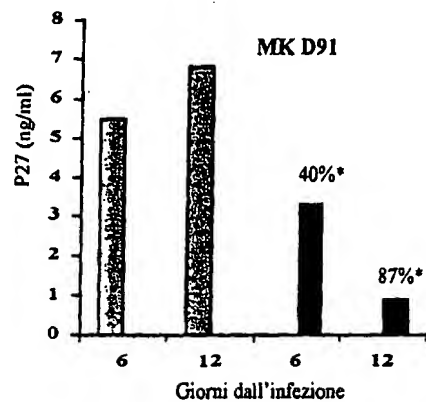
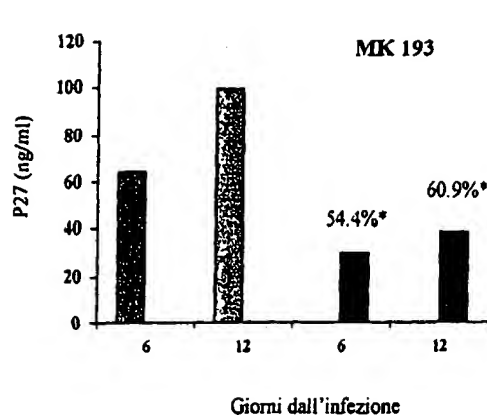


Figura 8

H 000399

NOTAR BARTOLO & GERVAZI S.p.A.

RM 97 A 000743



PHA+IL-2



Biglie anti-CD3/28 su PBMC CD8-3+28+

*) Percentuale di inibizione.

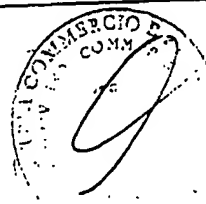


Figura 9

L MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DEPOSITO DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILE

RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione Snsoli Barbara

Residenza Via Festo Avieno, 176 - 00136 ROMA

2) Denominazione

Residenza

RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Maria Vittoria Principi del ...

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza

SAVOIA

via

n.

città

cap

(prov)

DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n.

città

cap

(prov)

TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci)

gruppo/sottogruppo

ITALIA ACCESSIBILE AL PUBBLICO: SI NO

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1)

3)

2)

4)

PRIORITA

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

1)

2)

CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N° es

c

SSV

n pag

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

c

SSV

n tav

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

c

RIS

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

c

RIS

designazione inventore

c

RIS

documenti di priorità con traduzione in italiano

c

RIS

autorizzazione o atto di cessione

c

RIS

nominativo completo del richiedente

attestati di versamento, totale lire

obbligatorio

IMPIANTO IL

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)

INTEGNA SI/NO

IL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

RM 97 A 000743

codice 58

RELAZIONE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

Reg A

anno millenovecento

20020531

il giorno

del mese di

Dicembre

il richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda di brevetto

per la concessione del brevetto soprariportato

ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

L'UFFICIALE ROGANTE
S. Allert

1354PTIT

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

H O O O O O O O O O

Descrizione della domanda di brevetto per Invenzione Industriale dal titolo:

"Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli od in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate"

A nome di: Barbara Ensoli

con sede in Roma

Inventore designato: Barbara Ensoli

Depositata il con il n.

La presente invenzione concerne un vaccino, profilattico e terapeutico, anti-HIV, anti-AIDS e contro i tumori e le sindromi associate all'infezione da HIV che utilizzi proteine, peptidi e DNA (wild-type o mutati) del Tat di HIV, da solo od associato a proteine, peptidi e DNA di altri prodotti virali (Nef, Rev, Gag) o di citochine ad effetto potenziante la risposta immune antivirale. L'invenzione prevede anche la immunizzazione tramite cellule dendritiche autologhe, l'immunizzazione mucosale o l'immunizzazione ex vivo di cellule del sangue periferico espanse tramite co-stimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28.

Stato dell'arte

L'AIDS (sindrome da immunodeficienza acquisita) è causata dal virus HIV e caratterizzata da immunodeficienza, insorgenza di tumori soprattutto il sarcoma di Kaposi (KS) e linfomi a cellule B, infezioni opportunistiche ed alterazioni del sistema nervoso centrale. Poiché l'AIDS è diffusa in tutto il mondo ed ha un'elevata mortalità, uno degli



RM R 0091

obiettivi più importanti di sanità pubblica è lo sviluppo di un vaccino anti-HIV profilattico e/o terapeutico. A tale scopo è stato principalmente utilizzato come immunogeno l'envelope virale o sue subunità, ma i risultati sono stati insoddisfacenti per l'estrema variabilità dell'envelope virale [Wain-Hobson, Curr. Opin. Genet. Dev. 3:878 (1993); Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, NH, 1995)]. Pertanto si ritiene che, in alternativa all'immunità sterilizzante, possa essere sufficiente ottenere il blocco della progressione dell'infezione (vaccino terapeutico). Inoltre, risposte immuni protettive possono essere ottenute utilizzando come immunogeni regioni di DNA dell'agente patogeno [Lu et al., J. Virol. 70:3978 (1996); Boyer et al., Nature Med. 3:526 (1997)]. In considerazione dei dati sperimentali pubblicati, l'inventore ritiene necessario utilizzare un vaccino allestito con prodotti virali diversi da env che siano più conservati tra i vari isolati di HIV, in grado di indurre un'efficace risposta immune sia umorale che cellulare, e che abbiano una funzione vitale per il virus.

Questi debbono essere sperimentati nel modello dei primati non umani in quanto il sistema immune è più simile a quello dell'uomo di quello di

animali filogeneticamente più distanti e nei quali si sviluppa AIDS dopo infezione. La proteina regolatrice Tat di HIV-1 possiede tutti questi requisiti: è conservata, immunogenica ed essenziale per le fasi precoci dell'infezione virale. Inoltre Tat svolge un ruolo fondamentale non solo nella replicazione virale e nella trasmissione e progressione dell'infezione, ma anche come fattore di insorgenza e di progressione

dei tumori associati all'AIDS, quali il KS che è il tumore più frequente associato all'AIDS, e di altre sindromi e sintomi che insorgono dopo l'infezione da HIV.

Tat è una proteina di 86-102 aminoacidi, a seconda dei ceppi virali codificata da due esoni. Tat è prodotta precocemente dopo l'infezione, si localizza nel nucleo e transattiva l'espressione dei geni virali interagendo con la sequenza bersaglio "Tat-responsive element" (TAR) dell'LTR [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Tat potrebbe anche avere un ruolo nella virulenza di HIV tramite altri meccanismi di azione nel ciclo virale [Huang et al., EMBO J. 13:2886 (1994); Neuvel et al., J. Virol. 70:5572 (1996); Harrich et al., EMBO J. 16:6 (1997); Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:8116 (1997)]. Il prodotto del primo esone (aminoacidi 1-72) è conservato in diversi isolati virali [Myers et al., Human retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics. Los Alamos. (1995)] ed è sufficiente per la transattivazione di HIV-1 [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Esso contiene 4 domini. Il dominio acidico (aminoacidi 1-21) è importante per l'interazione di Tat con proteine cellulari; la regione ricca in cisteine (aminoacidi 22-37) rappresenta il dominio di transattivazione. Questa regione è la più

conservata negli isolati primari [Meyerhans et al., Cell 58:901 (1989)].

La sostituzione della cisteina 22 con una glicina abolisce la capacità di Tat di transattivare l'HIV-LTR [Yang et al., J. Virol. 70:4576 (1996)]; la regione core (aminoacidi 38-48) è anch'essa conservata ed importante per l'attivazione, e la sostituzione della lisina 41 con una treonina inattiva l'attività transattivante di Tat sull'LTR di HIV [Kashanchi et al., J.

H O O O O O O O O O

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

1354PTIT

- Virol. 70:5503 (1996)); il dominio basico (aminoacidi 49-57), ricco in arginine e lisine, è necessario per la localizzazione nucleare e lega specificamente il suo RNA bersaglio (TAR) [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Inoltre, la regione basica è responsabile del legame del Tat extracellulare all'eparina e agli eparan solfati proteoglicani (HSPG) [Chang et al., AIDS 11:1421 (1997)]. Mutazioni nella regione basica aboliscono queste interazioni. La porzione carbossi-terminale di Tat non è necessaria per la transattivazione dell'LTR, ma contiene una sequenza arginina-glicina-acido aspartico (RGD), normalmente presente nelle proteine della matrice extracellulare (ECM), responsabile del legame di Tat ai recettori integrinici $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ e degli effetti di Tat sui tumori associati all'AIDS e sul sistema immune, vascolare e nervoso [Barillari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 149:3727 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994); Zauli et al., Blood 80:3036 (1996); Chang et al., J. Biomed. Sci. 2: 189 (1995)]. Durante l'infezione acuta delle cellule T con HIV-1 o dopo transfezione del gene tat in cellule COS-1, la proteina Tat è rilasciata in assenza di morte cellulare nell'ambiente extracellulare [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. Il rilascio di Tat dalle cellule infettate avviene anche in vivo poiché Tat è presente nel siero di soggetti infetti [Westendrop et al., Nature 375:497 (1995)] e nelle lesioni AIDS-KS [Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)]. Dopo il rilascio, una parte della proteina rimane in forma solubile mentre l'altra si lega agli HSPG della ECM. Tat legato agli HSPG può essere recuperato in una forma solubile dall'eparina. Il legame con l'eparina è dovuto alla regione



basica di Tat, previene gli effetti del Tat extracellulare e protegge la proteina dall'ossidazione tanto da averci consentito la purificazione di Tat con alta attività biologica [Chang et al., AIDS 11:1421 (1997)]. Tat extracellulare può essere internalizzato dalle cellule, può migrare nel nucleo e transattivare l'espressione del genoma virale [Frankel et al., Cell 55:1189 (1988); Mann et al., EMBO J. 10:1733 (1991); Marcuzzi et al., J. Virol. 66:4228 (1992); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. L'internalizzazione di Tat avviene per endocitosi mediata dal legame dell'RGD all' $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ [Barillari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7941 (1993) Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)] e/o tramite endocitosi mediata dalla regione basica che si lega agli HSPG.

Tat può attivare la replicazione virale e la diffusione dell'infezione anche tramite meccanismi indiretti che coinvolgono la modulazione dell'espressione di geni cellulari, che hanno un ruolo chiave nel controllo della sopravvivenza cellulare, e di citochine infiammatorie con effetto sulla replicazione virale [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)].

Oltre ad essere essenziale per la replicazione del virus, Tat svolge un ruolo molto importante nella patogenesi dell'AIDS. Tat è in grado di modulare la sopravvivenza e proliferazione di cellule infettate e non infettate determinando l'attivazione o repressione di citochine, quali IL-2 [Puri et al., AIDS Res. 11:31 (1995); Westendorp et al., J. Virol. 68:4177 (1994); Chirmule et al., J. Virol. 69:492 (1995)], o di geni che svolgono un ruolo chiave nel ciclo cellulare [Sharma et al., Biochem. Biophys. Res. Co. 208:704 (1995); Zauli et al., Blood 86:3823 (1995); Li et al.,

Science 268:229 (1995); Westendorp et al., Nature 375:497 (1995); Gibellini et al., Blood 89:1654 (1997)]. Gli effetti anti- o pro-apoptotici di Tat dipendono da diversi fattori quali il tipo cellulare, dal fatto che Tat sia espresso dalla cellula o aggiunto alla cellula, e dalla sua concentrazione [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Zauli et al., J. Immunol. 157:2216 (1996)].

Tat è il fattore responsabile dell'aumentata frequenza ed aggressività del KS in soggetti infettati da HIV-1 [Ensoli et al., AIDS Updates, Eds. V. De Vita, Jr., Hellman S., Rosenberg S.A., Lippincott J.B., Philadelphia: 7: 1 (1994); Corallini et al., Cancer Res. 53: 1 (1993)]. Il KS è un tumore di origine vascolare e la neoplasia più frequente in soggetti infettati dal virus. Tat induce le cellule KS e le cellule endoteliali attivate da citochine infiammatorie (IC) a migrare, esprimere collagenasi IV, invadere la ECM e proliferare, processi necessari per l'angiogenesi e l'invasione tumorale. [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994); Albini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4838 (1995); Fiorelli et al., J. Clin. Invest. 95:1723 (1995)]. Questi effetti del Tat sono indotti dalle IC, poiché esse ~~stimolano l'espressione dei recettori per Tat, l' $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ [Barillari et~~

al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 7941 (1993)]. Tat mima l'effetto delle proteine della ECM, quali la fibronectina e la vitronectina e la regione contenente la sequenza RGD e la regione basica sono necessarie per gli effetti del Tat extracellulare sulle cellule KS, sull'angiogenesi e sulla progressione del KS. La dimostrazione della presenza di Tat extracellulare e del suo legame in vivo ai recettori per il Tat nelle lesioni

1354PTIT

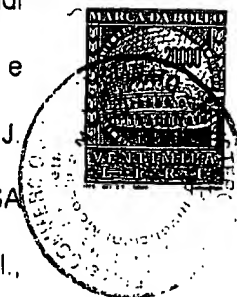
AIDS-KS [Ensoli et al., Nature 345: 84, 1994] sostiene l'idea che Tat sia coinvolto nell'insorgenza e nel mantenimento del KS associato all'AIDS. Inoltre topi transgenici per il gene tat sviluppano tumori tipo KS o di altro fenotipo a seconda del livello di espressione del transgene [Vogel et al., Nature 335: 601 (1988); Corallini et al., Cancer Res, 53: 5569 (1993)].

E' stato suggerito che Tat svolga anche un ruolo nei fenomeni iperproliferativi e nella patogenesi dei linfomi B frequentemente osservati in individui sieropositivi ed in topi-transgenici per tat [Vellutini et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 11:21 (1995)], tramite meccanismi che coinvolgono l'aumento dell'espressione di bcl-2 e di citochine [Puri et al., Cancer Res., 52:3787 (1992)]. Altre evidenze confermano un possibile ruolo di Tat nell'oncogenesi [Kim et al., Oncogene 7: 1525 (1992)].

Tat può anche attivare l'espressione di promotori virali quali quelli degli herpesvirus ed altri virus che si riattivano in soggetti con AIDS favorendo l'insorgenza e la progressione di infezioni opportunistiche [Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)].

Il Tat infine, sembra anche esercitare effetti neurotossici sia diretti,

tramite la regione basica e l'RGD, che indiretti tramite l'induzione di citochine infiammatorie ad effetto tossico sui neuroni del sistema nervoso centrale o sulla barriera ematoencefalica [(Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)]. In soggetti adulti ed in soggetti pediatrici le alterazioni del sistema nervoso centrale possono portare a demenza e ad alterazioni dell'apprendimento e del comportamento, rispettivamente.



Per quanto riguarda la risposta immune al Tat, diversi studi suggeriscono che gli anticorpi anti-Tat hanno un ruolo protettivo e possono controllare l'evoluzione della malattia in vivo [Reiss et al., J. Med Virol. 30:163 (1990); Rodman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7719 (1993); Rodman et al., J. Exp. Med. 175:1247 (1992); Re et al., J. Acquir. Immun. Defic. Syndr. 10:408 (1996)]. Inoltre, in vitro, anticorpi anti-Tat, non solo sopprimono l'internalizzazione, l'attivazione trans-cellulare di Tat e l'infezione [Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Re et al., J. Acq. Immun. Def. Synd. 10:408 (1995)], ma inibiscono anche la proliferazione, la migrazione indotta da Tat di cellule AIDS-KS e la formazione di lesioni simil-KS indotte da nel topo [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)]. Infine, i nostri risultati preliminari indicano che anticorpi anti-Tat sono assenti in soggetti con AIDS-KS suggerendo che questi individui non possiedono attività anticorpali bloccanti il Tat extracellulare e, pertanto, che questa proteina possa agire indisturbata.

Lo sviluppo di una risposta cellulo-mediata anti-Tat nella fase iniziale dell'infezione è importante nel controllo dell'infezione [Voss et al., Virology 208:770 (1995); Rinaldo et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 11:481

(1995); Harrer et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 12:585 (1996)] ed esiste una correlazione inversa tra la presenza di CTL specifiche anti-Tat e la progressione della malattia [van Baal et al., J. Gen. Virol. 78:1913 (1997)]. Simili risultati sono stati ottenuti da studi condotti su macachi inoculati con SIVmac [Lu et al., J. Virol. 70:3978 (1996); Venet et al., J. Immunol. 148:2899 (1992)]. Inoltre recenti studi in topi di varia specie in cui il Tat

è stato inoculato sia sotto forma di plasmide che di proteina hanno indicato che è possibile indurre una risposta sia umorale che cellulare verso la proteina [Hinkula et al., J. Virol. 71:5528 (1997)] benché si sia osservata variabilità da specie a specie di topo e questi risultati non siano stati riprodotti con gli stessi immunogeni in uno studio sui primati non umani [Quesada-Rolander et al., ABS 6-S1. 2nd European Conference on Experimental AIDS Research, Stockholm, Sweden, May 31-June 3 (1997)]. La mancanza di riproducibilità della sperimentazione vaccinale nel topo rispetto a quella dei primati non umani è frequente e probabilmente dovuta al sistema immune che è differente nelle due specie animali e che può dar luogo a risposte immuni differenti con lo stesso immunogeno, come evidenziato per l'HIV con la proteina Env del virus. Ciò richiede che gli immunogeni candidati per le sperimentazioni vaccinali per l'uomo siano saggiati nei primati non umani e non solo in specie inferiori.

L'inventore ritiene che altre proteine virali, o loro parti, possano essere associate al Tat e potenziare una risposta immune specifica contro l'HIV, ed essere di beneficio anche per la vaccinazione contro l'insorgenza di tumori e di altre patologie o sintomi associati all'infezione

di HIV. Questi prodotti sono le proteine Nef, Rev e Gag di HIV.

Il Nef è un'altra proteina regolatrice virale importante per lo sviluppo della malattia [(Allan et al., Science 230:813 (1985); Franchini et al., Virology 155:593 (1986); Guy et al., Nature 330:266 (1987)] prodotta precocemente dopo l'infezione e rilasciata nell'ambiente extracellulare. Nel sistema SIVmac/miacaco la presenza di Nef correla con alte dosi di

1354PTIT

carica virale e con la progressione verso l'AIDS [(Kestler et al., Science 248:1109 (1991)). Il Nef è più variabile del Tat [(Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics. Los Alamos, NH (1995)). Nef è una proteina immunogenica [(Gobert et al., Virology 176:458 (1990); Choppin et al., J. Immunol. 147:569 (1991); Culman et al., J. Immunol. 146:1560 (1991); Tahtinen et al., Virology 187:156 (1992)], ed è capace di indurre CTL [(Bourgault et al., J. Virol. 66:75 (1992); Couillin et al., J. Exp. Med. 180:1129 (1994)]. In particolare è stata evidenziata una regione immunodominante nella regione centrale di Nef (regione 73-144) che è riconosciuta dalla maggior parte dei pazienti con CTL anti-Nef.

Rev è una proteina regolatrice virale prodotta precocemente durante l'infezione [Gait et al., Trends Biochem. Sci. 18:255 (1993); Parslow, Human Retroviruses, Ed. B.R. Cullen, IRL press, Oxford, England, p. 101 (1993)] e rilasciata nell'ambiente extracellulare. Rev è essenziale per la replicazione di HIV e la progressione della malattia, ed è codificata da due esoni, parzialmente sovrapposti a quelli codificanti per Tat. Rev è una proteina nucleare [Felber et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:1495 (1989)] necessaria per l'espressione degli RNA messaggeri

virali per le proteine tardive [Malim et al., Nature 338:254 (1989)]. Rev è una proteina altamente conservata fra i diversi isolati virali di HIV-1 [Meyers et al., Human Retroviruses and AIDS: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences, Los Alamos Laboratory, Los Alamos, NM p.1 (1993)] ed è immunogenica. Induce, infatti, la produzione di anticorpi specifici diretti contro i due domini

funzionali della proteina [Pilkington et al., Mol. Immunol. 33:439 (1996)] durante l'infezione naturale nell'uomo [Reiss et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 5:621 (1989)] e dopo inoculazione nel topo [Hinkula et al., J. Virol. 71:5528 (1997)]. La diminuzione dei livelli sierici degli anticorpi anti-Rev sembra correlare con la progressione verso l'AIDS [Reiss et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 5:621 (1989)]. Rev è in grado di indurre CTL sia nell'uomo che nella scimmia [van Baalen et al., J. Gen. Virol. 78:1913 (1997); Venet et al., J. Immunol. 148:2899 (1992)] ed è stato riportato che una risposta CTL specifica anti-Rev, precocemente durante l'infezione, correla inversamente con la progressione della malattia [van Baalen et al., J. Gen. Virol. 78:1913 (1997); Venet et al., J. Immunol. 148:2899 (1992)].

Un altro bersaglio virale è rappresentato dal gene gag che è espresso tardivamente durante l'infezione e codifica per un gruppo di proteine strutturali del capsido altamente immunogeniche [Bruisten et al., J. Infect. Dis. 166:620 (1992); Sipsas et al., J. Clin. Invest. 99:752 (1997)].

I titoli anticorpali anti-Gag rimangono elevati e stabili nella fase asintomatica dell'infezione, mentre diminuiscono a livelli molto bassi quando l'infezione progredisce ad AIDS conclamato, in concomitanza

con il calo dei linfociti CD4+ e il ritrovamento del virus nel sangue [Baur et al., J. Infect. Dis. 165:419 (1992); Koup et al., J. Virol. 68:4650 (1994)]. Le proteine del Gag inducono attività CTL precocemente durante l'infezione, sia nell'uomo che nei primati [Mcfarland et al., J. Inf. Dis. 170:766 (1994); Yasutomi et al., J. Virol. 70:678 (1996)], e la loro presenza correla significativamente con il controllo della viremia iniziale

nell'aumentare la resistenza nei confronti di molte infezioni causate da batteri, funghi, virus ed ha un'elevata attività antitumorale. Si pensa che i virus che inducono un'immunodepressione, quali l'HIV e il virus del morbillo, agiscano anche attraverso meccanismi che sopprimono la produzione di IL-12. [Grosjean et al, J. Exp. Med. 186: 801 (1997); Fugier-Vivier et al, J. Exp. Med. 186: 813 (1997) Schnorr et al, Proc.

4020399

Natl. Acad. Sci. USA. 94: 5326 (1997)).

L'IL-15 è una citochina pleiotropica espressa dai tessuti non linfoidi, dai monociti/macrofagi attivati e dalle cellule dendritiche [Quinn et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 239:6 (1997); Jonuleit et al., J. Immunol. 158:2610 (1997)]. L'IL-15 svolge un ruolo importante nella regolazione dell'attività NK, della proliferazione dei linfociti T e dell'attività CTL [Jullien et al., J. Immunol. 158:800 (1997); Carson et al., J. Clin. Invest. 99:937 (1997)]. L'IL-15 induce l'espansione dei CTL contro antigeni di HIV, in assenza di IL-2 e linfociti T CD4+ funzionali [Kanai et al., J. Immunol. 157:3681 (1996); Agostini et al., Blood 90:1115 (1997)]. Inoltre, l'IL-15 come l'IL-2, induce la comparsa di linfociti dotati di attività citotossica ("lymphokine-activated killer", LAK) e stimola la produzione di IFN γ nei PBMC di pazienti sieropositivi [Lucey et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4:43 (1997)]. L'IL-15 attiva i monociti a produrre chemochine, svolgendo un ruolo di regolazione nell'innescare dei processi infiammatori [Badolato et al., Blood 90:2804 (1997)].

Nell'ambito dei diversi sistemi volti alla generazione di vaccini efficaci antivirali ed antitumorali, l'inventore ritiene che l'utilizzazione di cellule dendritiche possa essere un elemento chiave nell'induzione della

risposta immune al Tat. Ciò è dovuto al fatto che queste sono le cellule più efficienti nel presentare l'antigene e le uniche in grado di stimolare linfociti vergini, in assenza di adiuvanti [Steinman R.M., Exp. Hematol. 24: 859 (1996)]. L'uso di cellule dendritiche sostituisce la funzione di numerosi adiuvanti che consiste nell'indurre una risposta immunitaria non specifica (immunità naturale) che a sua volta in presenza

dell'antigene genera una potente risposta specifica primaria.

Poiche' la trasmissione dell'infezione da HIV avviene prevalentemente a livello mucosale (genitale e rettale nell'adulto, orale nel neonato), l'inventore ritiene che l'induzione di immunita' protettiva a livello mucosale e' un obiettivo di primaria importanza. Numerosi studi hanno recentemente dimostrato la possibilita' di indurre immunizzazione mucosale locale e sistemica. In particolare la via nasale e quella orale si sono dimostrate fra le piu' efficienti nell'indurre una efficace risposta immunitaria mucosale anche in siti distanti, quali le mucose genitali [Rosenthal et al., Seminars in Immunology 9:303 (1997); O'Hagan et al., Novel Delivery Systems for Oral Vaccines, Eds. O'Hagan, D.T. CRC Press Boca Raton, FL, p. 176 (1994)].

Studi recenti hanno dimostrato che la costimolazione di linfociti CD4+ con biglie paramagnetiche ricoperte con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 determina l'espansione logaritmica e policlonale dei linfociti provenienti da soggetti infetti con HIV [Levine et al., Science. 272: 1939-1943 (1996)] senza attivare la replicazione e la propagazione del virus. Questa attivita' antivirale e' conseguente alla modulazione negativa dell'espressione di CCR5, il corecettore per i ceppi monocitotropi

dell'HIV-1 [Carrol et al, Science. 276: 273-276, (1997)] e, in misura minore agli elevati livelli di chemochine indotti mediante costimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 [Riley et al, J.Immunol. 158: 5545-5553, (1997)]. L'inventore ritiene che la possibilita' di espandere linfociti autologhi da soggetti infettati con HIV in assenza di replicazione/propagazione virale consente di approntare un efficace

immunizzazione ex vivo, descritto negli esempi, che può essere di grande utilità nell'allestimento di un vaccino anti-Tat.

L'inventore ritiene che queste osservazioni suggeriscono che l'immunizzazione con Tat da solo o combinato con altri prodotti virali o citochine immunomodulanti, o loro parti, potrebbe bloccare la replicazione virale in soggetti esposti dopo la vaccinazione e in soggetti già infetti, mantenendo l'infezione in uno stadio abortivo che, pertanto, potrebbe essere controllata più facilmente dal sistema immune. Pertanto l'inventore ritiene che un vaccino basato sul Tat dovrebbe essere in grado di indurre una risposta immunitaria, sia umorale che cellulare, sufficiente a bloccare o ridurre la replicazione o la trasmissione del virus e quindi a proteggere dall'infezione, dalla malattia e dall'insorgenza dei tumori e di altre sindromi e sintomi associati all'AIDS. È possibile, quindi, impiegare il vaccino anti-Tat a scopi sia di prevenzione che di terapia. Infatti, una risposta umorale contro Tat potrebbe neutralizzare gli effetti di Tat extracellulare riducendo e limitando l'infezione, e gli effetti del Tat extracellulare, mentre la risposta cellulo-mediata verso Tat e altre proteine virali, incluse nella formulazione vaccinale, dovrebbe distruggere le cellule replicanti il virus e, quindi, contenere l'infezione, e

dare tempo sufficiente al sistema immune dell'ospite di sviluppare una risposta immune completa verso tutte le componenti virali in assenza di danni irreparabili dovuti all'alta replicazione virale.

Rivendicazioni

L'oggetto dell'invenzione riguarda:

H 02.03.99

1. un vaccino proteico o peptidico da applicare all'uomo, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi ed i sintomi associati all'infezione da HIV, che comprende proteine ricombinanti del Tat wild-type e dei suoi mutanti (Seq. 1-5), espresse e purificate come descritto, o dei suoi peptidi wild-type o mutanti (Pep. 1-7), che siano somministrati da soli o coniugati con l'epitopo T-helper universale del tossoide tetanico o altri peptidi T-helper;

2. un vaccino come descritto sopra, combinato con proteine ricombinanti o peptidi di Nef, Rev o Gag di HIV, oppure somministrato sotto forma di proteine di fusione Tat/Nef, Tat/Rev, Tat/Gag o parte delle stesse;

3. un vaccino come descritto sopra, in combinazione con proteine ricombinanti di citochine immunomodulatorie, quali IL-12, IL-15 od altre molecole, o parti delle stesse, potenzianti la risposta immune antivirale, oppure somministrato sotto forma di proteine di fusione Tat/IL12, Tat/IL-15 o Tat/altre molecole, o parte delle stesse, potenzianti la risposta immune antivirale;

4. un vaccino a DNA da applicare all'uomo, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi ed i sintomi associati all'infezione da HIV, che comprende vettori che codificano Tat wild-type o i suoi

mutanti (Seq. 1-5), o parti di essi, inseriti nel vettore plasmidico pCV0 o altri vettori;

5. un vaccino a DNA come descritto al punto 4, in combinazione con molecole di DNA, inserite nel vettore plasmidico pCV0 o altri vettori, dei geni rev, nef e gag di HIV, o parte degli stessi, oppure somministrato sotto forma di plasmide co-esprimente tat/rev, tat/nef.



H 0 0 0 3 9 9


tat/gag o parte degli stessi;

6. un vaccino a DNA come descritto sopra, in combinazione con molecole a DNA, basate sul plasmide pCV0 o altri vettori, dei geni per le citochine immunomodulatrici IL-12, IL-15 o altri geni immunomodulatori, o parte degli stessi, potenzianti la risposta immune antivirale, oppure somministrato sotto forma di plasmide co-esprimente tat/IL-12, tat/IL-15 o tat/altre molecole, o loro parti, in grado di potenziare la risposta immune antivirale;

7. un vaccino anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA da solo o combinato come sopra, descritto per l'immunizzazione con cellule dendritiche autologhe mediante trattamento ex vivo;

8. un vaccino anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA, da solo o combinato come sopra descritto per l'immunizzazione mucosale (nasale, orale, vaginale o rettale);

9. un vaccino anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA, da solo o combinato come sopra descritto, per l'immunizzazione ex vivo di cellule dal sangue periferico di soggetti infettati che siano espanse tramite co-stimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 ed anti-CD28 e reinfuse nell'ospite.

10. un vaccino terapeutico anti-Tat proteico, peptidico e/o a DNA, come descritto, combinato con inibitori della replicazione virale.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione concerne un vaccino, profilattico e terapeutico, contro l'infezione da HIV, la progressione verso l'AIDS, lo sviluppo di tumori e di altre sindromi e sintomi insorgenti in soggetti infettati dal

1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

virus, che utilizzi molecole ricombinanti, proteiche, peptidiche e a DNA di Tat di HIV. Più in particolare, l'invenzione concerne un vaccino basato su Tat di HIV-1 come immunogeno, inoculato sotto forma di DNA e/o di proteina ricombinante o di peptidi, da solo o in combinazione con altri geni o prodotti genici virali (Nef, Rev, Gag) o parti di esse, oppure in combinazione con diverse citochine immunomodulatrici (IL-12, IL-15) o il gene codificante per una citochina immunomodulatrice o parte di esse. Tat, Nef, Rev, Gag e le citochine immunomodulatrici sono somministrati sia sotto forma di una miscela di proteine ricombinanti, di peptidi o di proteine di fusione (Tat/Nef, Tat/Rev, Tat/Gag, Tat/IL-12, Tat/IL-15) che di DNA plasmidici. E' inoltre descritto un metodo di immunizzazione che utilizza cellule dendritiche autologhe trattate ex vivo con la proteina Tat ricombinante, o suoi peptidi, da sola, o con una miscela di proteine ricombinanti o peptidi (Tat, Nef, Rev, Gag) o con la proteina Tat e una o più citochine immunomodulatrici, o parti delle stesse, oppure trasdotte con vettori eucariotici contenenti Tat da solo, o con geni virali codificanti per Nef, Gag o Rev, oppure Tat e il gene codificante per una citochina immunomodulatrice o parte di essi. E' anche descritto l'uso per l'induzione di una risposta immune a livello

mucosale. Il Tat, o suoi peptidi, da sola o in combinazione con con proteine virali e/o citochine è inoculata anche a livello mucosale per potenziare ed indurre la risposta immunitaria locale. La proteina Tat dell'HIV, o sue subunità, sarà anche utilizzata per immunizzare ex vivo linfociti CD4+ e CD8+ isolati dal sangue periferico di soggetti infetti. Successivamente, le cellule specifiche per l'antigene Tat saranno

espanse in vitro mediante costimolazione con anticorpi monoclonali diretti contro il CD3 ed il CD28 e reinfuse. E' infine descritto l'uso di mutanti di Tat, identificati negli esempi, da utilizzare come immunogeni in alternativa a Tat wild type. I mutanti di Tat sono i) nella regione cisteinica (cys22) e ii) nella regione del core (lys41), iii) il mutante deleto della sequenza RGD; iv) il doppio mutante nella lisina 41 e nell'RGD. In alternativa all'uso di mutanti di Tat o peptidi di Tat (wild type o mutati in maniera analoga alla proteina) in caso di vaccinazione terapeutica si utilizzeranno, in congiunzione con l'immunogeno, inibitori della replicazione virale.

La presente invenzione verrà ora descritta in suoi esempi specifici, illustrativi, ma non limitativi, in cui si farà riferimento alle seguenti figure.

Breve descrizione delle figure:

FIGURA 1. Test di CAT per determinare la capacità della proteina Tat-cys22 (Tat22) purificata di competere con l'attività transattivante della proteina Tat wild type. Cellule H3T1, contenenti integrato nel proprio genoma il vettore "reporter" HIV-1 LTR-CAT [Sodroski et al., Science 227:171, (1985)], in cui il gene per l'enzima cloramfenicolo acetil transferasi (CAT) è posto sotto il controllo trascrizionale del promotore

LTR di HIV-1, sono state incubate in presenza della proteina Tat wild type (100 ng) da sola o in combinazione con un eccesso molare di proteina Tat-cys22 (1 µg). L'attività transattivante di Tat sull'LTR di HIV-1 e la capacità della proteina Tat-cys22 di competere con Tat wild type, sono state determinate dopo 48 ore, sottoponendo aliquote degli estratti citoplasmatici (corrispondenti a 200 µg di proteine) al saggio per la



determinazione dell'attività dell'enzima CAT, come descritto [Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. Sono indicate le percentuali (%) di acetilazione del ^{14}C -cloramfenicolo.



FIGURA 2 . Risposta umorale del tipo IgG specifica anti-Tat in scimmie

vaccinate con la proteina Tat, determinata mediante saggi immunoenzimatici (ELISA). (A) riporta i risultati ottenuti su due scimmie inoculate con 10 o con 100 μg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 μl di siero autologo e 250 μl di RIBI, per via sottocutanea in un sito:

(B) riporta i risultati relativi alla scimmia di controllo non inoculata. Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 5, 10, 15, 22 e 27 settimane. La presenza della risposta anticorpale anti-Tat nei plasmi degli animali vaccinati veniva valutata mediante ELISA da noi allestiti e caratterizzati. La proteina Tat, era adsorbita ai pozzetti di piastre da 96 di PVC (100 ng/pozzetto in 200 μl di tampone carbonato 0.05 M pH 9.6) per 12 ore a 4°C. Dopo 3 lavaggi con PBS-A 1x contenente Tween 20 (0.05%), si aggiungevano i sieri (in doppio) diluiti 1:50 in 200 μl di tampone carbonato, si incubava a 37°C per 90', si lavavano i pozzetti con PBS-A 1x/Tween 0.05% e si evidenziava la presenza degli immunocomplessi mediante l'aggiunta di 100 μl di anticorpo secondario

(diluito 1:1000 in PBS-A 1x/Tween 0.1%/BSA 1%) coniugato con perossidasi di rafano, per 90' a temperatura ambiente. Dopo 5 lavaggi dei pozzetti, si aggiungevano 100 μl di substrato della perossidasi (ABTS 1 mM, Amersham) per 30-45' a temperatura ambiente e quindi si procedeva alla lettura spettrofotometrica a 405 nm. Ogni saggio ELISA

includeva un siero policlonale di coniglio anti-Tat (controllo positivo) diluito da 1:200 a 1:6400, e i sieri delle scimmie prelevati al tempo 0 (controllo negativo) diluiti 1:50. Il valore di cut off è stato considerato come la media (\pm S.D.) delle letture dei sieri di tutte le scimmie, prelevati al tempo 0, ottenute in tutti gli esperimenti. I risultati riportati nell'istogramma relativi a ciascun campione corrispondono alla media delle densità ottiche a 405 nm delle letture dei due pozzetti, sottratti del valore del cut off \pm S.D (Δ OD405). $>2,7$: i valori di lettura erano fuori scala.

FIGURA 3. Titolazione dei plasmi delle scimmie inoculate con 100 e 10 μ g di proteina Tat ricombinante, descritti nella figura 2. I risultati in ordinata sono rappresentati come il reciproco della diluizione più alta del siero che a 405 nm dava una lettura superiore al valore di cut off.

FIGURA 4. Analisi della risposta umorale anti-Tat specifica di tipo IgM in scimmie inoculate con Tat e determinata mediante saggio ELISA. Tre scimmie (M1-3) inoculate sottocute con 10 μ g di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 μ l di siero autologo e 250 μ l di RIBI e 3 scimmie (M4-6) inoculate sottocute con 10 μ g di Tat ricombinante risospesa in 250 μ l di siero autologo e 250 μ l di Alum; 2 scimmie di

controllo inoculate sottocute con RIBI (250 μ l e 250 μ l di siero autologo) (M7) e con Alum (250 μ l e 250 μ l di siero autologo) (M8). Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 6, 11 e 15 settimane. L'esecuzione dei saggi ELISA e la determinazione dei valori di cut off sono descritti nella figura 2. In questo caso i sieri degli animali erano saggiati (in

doppio) alla diluizione 1:100 e veniva utilizzato come anticorpo secondario un siero di capra anti-IgM di scimmia coniugato con perossidasi di rafano e diluito 1:1000.

FIGURA 5. Analisi della risposta umorale del tipo IgG specifica anti-Tat in scimmie inoculate con Tat determinata mediante saggio ELISA. Tre scimmie (M1-3) inoculate con 10 µg di Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI e 3 scimmie (M4-6) inoculate con 10 µg di Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di Alum; due scimmie di controllo inoculate con RIBI (250 µl e 250 µl di siero autologo) (M7) o con Alum (250 µl e 250 µl di siero autologo) (M8). Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 6, 11 e 15 settimane. L'esecuzione dei saggi ELISA e la determinazione dei valori di cut off sono descritti nella figura 2. >2,7: il valore era fuori scala.

FIGURA 6. Titolazione dei sieri delle scimmie inoculate con la Tat ricombinante (10 µg) in presenza dell'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum (M4-6). I risultati sono rappresentati per ciascun siero come il reciproco della diluizione più alta del siero che a 405 nm dava una lettura superiore al valore di cut off.

FIGURA 7. ~~Analisi della risposta di ipersensibilità ritardata a Tat~~ mediante esecuzione dello skin test. La proteina Tat (5, 1 e 0.2 µg), risospesa in 150 µl di PBS contenente lo 0.1% di BSA e il tampone in cui è risospesa Tat, erano inoculati intradermicamente in un'area tricotomizzata del dorso dell'animale. L'area trattata veniva fotografata al tempo 0 e dopo 24, 48 e 72 ore. Le scimmie di controllo erano

H 00 00 00
11/11/11

inoculate solo con il tampone. Nella figura e' riportato un esempio relativo alla 15^a settimana della scimmia M2 a 48 ore dopo l'inoculazione degli immunogeni. E' evidente una forte reazione positiva a Tat.

FIGURA 8. Cinetica della risposta proliferativa di PBMC di *Macaca fascicularis* alla costimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 su biglie paramagnetiche (biglie anti-CD3/28). I PBMC isolati dal sangue periferico erano depleti della sottopopolazione CD8 positiva tramite l'impiego di metodiche immunomagnetiche. Successivamente, parte dei linfociti CD8-depleti veniva stimolata con PHA e IL-2 (40U/ml) a partire dal giorno 3; la parte rimanente veniva fatta aderire alle biglie recanti gli anticorpi anti-CD3/28 ottenendo un popolazione di linfociti CD8-depleti e CD3/28 positivi. A questa frazione veniva addizionata IL-2 (40U/ml) a partire dal giorno 10 di coltura. Le cellule erano contate e la loro vitalità determinata ogni 2-3 giorni. Il rapporto biglie : cellule veniva mantenuto costante. E' riportato il numero di cellule nel tempo.

FIGURA 9. Effetto antivirale della costimolazione con biglie anti-CD3/28 su PBMC di *Macaca fascicularis*. I linfociti CD8-depleti e CD8-depleti CD3+/CD28+, ottenuti con le metodiche descritte nella figura 8 da 4

scimmie, venivano stimolati come descritto nell'esempio 5. Le due frazioni erano infettate *in vitro* al giorno 0 con 0.1 M.O.I. di SIVmac251/63M. La stimolazione veniva effettuata con PHA e IL-2 aggiunta dal giorno 3, e con le biglie anti-CD3/28 senza aggiunta di IL-2 esogena. La produzione virale veniva valutata determinando i livelli di p27 (ng/ml) sui sovrantananti delle colture al giorno 6 e 12 dall'infezione,

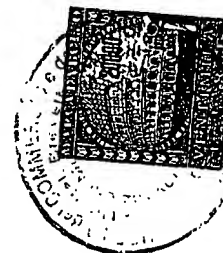
come descritto nell'esempio 5.

Esempio 1. Espressione, purificazione e caratterizzazione della proteina Tat (isolato IIIB), proteine mutanti del Tat e peptidi wild type e mutanti di Tat.

Notevoli difficoltà sono state incontrate in passato per la purificazione ed il mantenimento dell'attività biologica della proteina Tat a causa della facilità con la quale si ossida, si aggrega e perde attività. Ciò è dovuto all'alto contenuto in cisteine che formano legami intra- ed inter-molecolari modificando la conformazione della proteina nativa [Viscidi et al., Science 246:1606 (1989); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. Il cDNA del gene tat (Seq. 1, esempio 2), che è stato clonato nel vettore pL-syn fornitoci dai Dr. J. F. DeLamarier e B. Allet (Glaxo Institute for Molecular Biology S.A., Ginevra, Svizzera), è stato usato per l'espressione della proteina in E.Coli.

Un primo procedimento che abbiamo utilizzato e che ha portato all'ottenimento di una proteina attiva, prevedeva passaggi successivi di cromatografia liquida ad alta pressione e cromatografia a scambio ionico [Bohan et al., Gene Expr. 2:391 (1992); Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. La proteina così ottenuta è pura per oltre il 95% ed

attiva [Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993); Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)], tuttavia non si otteneva una buona riproducibilità da lotto a lotto, dovuta all'ossidazione della proteina, che rappresenta il problema principale con le preparazioni di Tat commerciali. In seguito alla nostra osservazione che la regione basica del Tat ha una forte affinità per l'eparina e che l'eparina ne impedisce l'ossidazione, abbiamo usato la



cromatografia d'affinità con eparina e definito un nuovo protocollo di purificazione di Tat, come descritto da Chang et al., [AIDS 11: 1421 (1997)]. Cellule (10 gr. di peso) di *E.coli* esprimenti Tat erano sonicate in 40 ml di tampone di lisi (fosfato disodico 20mM, pH 7.8; glicerolo al 2.5%; PMSF 0.2 mM; DTT 5 mM; mannitolo 50 mM; acido ascorbico 10 mM; NaCl 500 mM) usando un Ultrasonic Liquid Processor (Modello XL2020, Heat System Inc) con tre scariche di 20 secondi ciascuna. Il lisato era centrifugato a 12,000 g per 30 minuti ed il sovranatante incubato per un'ora a temperatura ambiente con 2 ml di resina eparina sefariosio, pre-lavata con il tampone di lisi. La resina era caricata su una colonna di vetro e lavata con tampone di lisi fino a quando non era più misurata la proteina nel liquido di lavaggio. Il materiale legato era eluito con tampone di lisi contenente 2M NaCl e l'eluato raccolto in frazioni da 1 ml. L'omogeneità della proteina eluita era analizzata tramite elettroforesi su gel (SDS-PAGE). La proteina purificata era conservata liofilizzata a -70°C e risospesa in tampone degassato prima dell'uso.

L'attività biologica della proteina Tat purificata, secondo il protocollo appena descritto, era valutata con un saggio di "rescue" dell'infezione virale in cellule HLM-1, che derivano da cellule HeLa-CD4+ contenenti

provirus difettivi nel gene tat, ottenute e descritte da Sadaie et al. [New Biol. 2:479 (1990)]. Il saggio di "rescue" dell'infezione virale, descritto da Ensoli et al. [J. Virol. 67:277 (1993)], consisteva nel complementare la mancanza di espressione di Tat nelle cellule HLM-1 (2×10^5) mediante l'aggiunta di proteina Tat esogena (2 µg/ml) e valutando la replicazione virale tramite la determinazione, con un kit ELISA di "antigen capture"

commerciale, della concentrazione dell'antigene p24 rilasciato nel terreno di coltura 48 ore dopo l'aggiunta della proteina Tat esogena. I risultati degli esperimenti di "rescue", descritti da Chang et al. [AIDS 11: 1421 (1997)], dimostrano che la proteina Tat, purificata tramite questa procedura era attiva e che questa procedura di purificazione era superiore, più semplice e meno costosa, sia per la purezza che per la sua attività biologica rispetto a quella descritta in precedenza [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990), J. Virol 67:277 (1993), Nature 371:674 (1994)].

Diverse preparazioni di Tat ricombinante purificato come appena descritto sono state inoculate in presenza di adiuvante di Freund in topi e conigli, secondo protocolli standard [(Antibodies - A laboratory manual, Eds. Harlow E., Lane D., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]. I risultati relativi alla risposta anticorpale indotta dall'immunizzazione sono riportati in Tabella 1.

TABELLA 1.

Analisi della risposta anticorpale specifica anti-Tat nei sieri di topi e conigli immunizzati con la proteina Tat ricombinante.^a

Anticorpo	OD-ELISA/Tat			Western blot
	1:500	1:1000	1:2000	
anti-Tat				
Coniglio	0.651	0.400	0.175	+
Topo	0.502	0.240	0.150	+

^aLa proteina Tat ricombinante prodotta in *E.coli* è stata utilizzata per

H 0 0 . 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
[Handwritten signature]

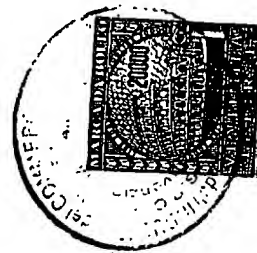
immunizzare topi e conigli secondo protocolli di immunizzazione standard [(Antibodies - A laboratory manual, Eds. Harlow E., Lane D., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)). I sieri degli animali immunizzati sono stati analizzati mediante saggio ELISA per la presenza di anticorpi anti-Tat utilizzando tre diluizioni del siero (1:500 a 1:2000). I risultati riportati rappresentano la media delle letture a 405 nm di due conigli e tre topi. I sieri sono stati inoltre saggiati mediante Western blot sulla proteina Tat ricombinante (100 ng) migrata in gel SDS-poliacrilamide.

I risultati della Tabella 1 dimostrano che Tat ricombinante da noi prodotta era in grado di indurre una risposta anticorpale in ambedue le specie di animali, come saggiato mediante ELISA e Western blot, utilizzando come antigene la proteina Tat ricombinante. Questi anticorpi erano in grado di inibire l'internalizzazione e le attività biologiche del Tat [Ensoli et al., Nature 345:84 (1990), J. Virol. 67:277 (1993), Nature 371:674 (1994)]. Il vettore pL-syn ed il protocollo di purificazione della proteina Tat sono impiegati per esprimere e purificare i mutanti di Tat descritti nell'Esempio 2. L'attività biologica delle proteine Tat mutate purificate è misurata tramite saggi di "rescue" dell'infezione virale in

cellule HLM-1, saggi di proliferazione cellulare in cellule di KS ed in vivo nel topo, come descritto sopra per la proteina Tat wild-type. Inoltre, le proteine Tat mutate sono saggiate in presenza di Tat wild-type (a concentrazioni seriali) per verificare l'effetto transdominante negativo sulla replicazione virale in saggi di "rescue" in cellule HLM-1. Il vettore pL-syn e il protocollo di purificazione sono impiegati per esprimere e purificare proteine di fusione così composte: Tat (wild type o i suoi

H O P O S S E

mutanti)/IL-12 o Tat (wild type o i suoi mutanti)/IL-15 o parti delle stesse oppure Tat (wild type o suoi mutanti)/altre molecole (o parte delle stesse) che si dimostrino in grado di potenziare la risposta immune al Tat da solo od associato ad altri prodotti virali. Le molecole ricombinanti di fusione sono costruite utilizzando le sequenze e i primers descritti negli esempi 2 e 3. Alternativamente come immunogeni sono utilizzati peptidi sintetici corrispondenti a regioni di Tat o di altri prodotti virali o di citochine da usare in combinazione con Tat. Le sequenze peptidiche di



Tat sono le seguenti:

Pep. 1. MEPVDPRLEPWKHPGSQPKT

Pep. 2. ACTNCYCKKCCFHCQVCFIT

Pep. 3. QVCFITKALGISYGRK

Pep. 4. SYGRKKRRQRRRPPQ

Pep. 5. RPPQGSQTHQVSLSKQ

Pep. 6. HQVSLSKQPTSQSRGD

Pep. 7. PTSQSRGDPTGPKE

Peptidi mutati di Tat conterranno le stesse sostituzioni aminoacidiche delle proteine Tat mutate descritte nell'esempio 2. I peptidi saranno

utilizzati in combinazione con il peptide rappresentante l'epitopo T-helper universale del tossoide tetanico o altri peptidi T-helper [Lanzavecchia, Science 260: 937 (1993)].

Esempio 2. Costruzione e caratterizzazione dei mutanti del gene tat

Abbiamo prodotto 19 mutanti in diverse regioni di Tat, mediante mutagenesi sito specifica o per delezione. La sequenza di ciascun DNA mutato è stata controllata mediante sequenziamento. I cDNA del gene

1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

H 0 0 . 0 0 9 9

tat mutati sono stati clonati nel sito PstI del vettore pCV0, descritto nell'Esempio 3. Ciascun mutante è stato cotrasfettato, come descritto da Ensoli et al. [J. Virol. 67:277 (1993)], in cellule COS-1, o nella linea di linfociti T Jurkat, con il plasmide HIV-1 LTR-CAT, in cui il gene reporter CAT è posto sotto il controllo trascrizionale dell'LTR di HIV-1. I

risultati di questi esperimenti non sono pubblicati e sono riportati in Tabella 2.

TABELLA 2.

1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

H.O.O.0000

*Effetto dei mutanti di Tat sulla transattivazione dell'HIV-1 LTR-CAT ed**effetto di blocco (transdominante negativo) sull'attività di Tat wild-type*

MUTANTI	Attività transattivante ^a		Attività transdominante ^b
	Media (fold)	(valori min-max)	(% inibizione)
CYS 22	0.09	(.021-.22)	21
THR 23	0.36	(.16-1)	
THR 23A	0.30	(.16-.78)	
ASN 24	0.34	(.34-.82)	
ASN 24A	0.42	(.45-.95)	
TYR 26	0.14	(.08-.19)	
LYS 28/29	0.52	(.19-1.04)	
CYS 30	0.30	(.045-.65)	
CYS 31	0.60	(.27-1.09)	
PHE 32	0.31	(.077-.097)	
LYS 33	0.04	(.0027-.068)	46
GLU 35	0.31	(.19-.43)	
PHE 38	0.05	(.043-.057)	98
LYS 41	0.04	(.025-.061)	97
TYR 47	0.58	(.31-.8)	
57 A	0.35	(.26-.44)	
TAT-RGD	0.94	(.73-1.15)	
TAT-KGE	1.11	(.67-1.49)	
TAT wild-type	1	1	

H 00.00.00
11.02.00

a) I risultati sono riportati come incrementi di attivazione relativi ai valori di attività CAT indotti dal Tat wild type (Fold = 1). b) I risultati sono espressi in percentuale (%) di inibizione dell'attività del Tat wild type.

Dai risultati presentati in Tabella 2 si osserva che per la maggior parte dei mutanti l'effetto transattivante l'LTR di HIV-1 era molto ridotto o assente, ad eccezione del mutante per delezione della sequenza RGD che aveva attività paragonabile al Tat wild-type. Abbiamo scelto i 4 mutanti (cys22, lys33, phe38, lys41) con la più bassa attività transattivante (quasi nulla), e ne abbiamo determinato l'effetto transdominante negativo sull'attività transattivante di Tat wild-type. A questo scopo cellule COS-1 erano co-trasfettate con ciascun vettore contenente un mutante di Tat ed il vettore pCV-Tat (nel rapporto molare di 10:1) in presenza del vettore HIV-1 LTR-CAT. Come si osserva in Tabella 2, i mutanti lys41 e tyr47 inibivano pressoché completamente l'attività di Tat, mentre i mutanti lys33 e cys22 inibivano parzialmente l'attività di Tat. Tuttavia, la proteina ricombinante cys22 (descritta nel successivo Esempio 3) era in grado di competere con la proteina Tat wild-type nel transattivare l'HIV-1 LTR-CAT (figura 1). Sono stati scelti

un mutante nella regione cisteinica (cys22), uno nella regione core (lys41), uno nel secondo esone di Tat deleto della sequenza RGD (RGDΔ) ed un doppio mutante contenente la mutazione nella lys41 e la delezione della sequenza RGD (lys41-RGDΔ).

La sequenza dell'inserto tat e dei mutanti selezionati per la vaccinazione è riportata qui di seguito. E' descritta una serie di mutanti

nel gene tat che sono stati preparati per 1) sostituzione di una base per dar luogo ad una sostituzione aminoacidica e 2) delezione di una sequenza di basi per dar luogo ad una delezione dei corrispondenti aminoacidi. Le sostituzioni e delezioni delle basi sono state ottenute per mutagenesi sito-diretta. Le sequenze del gene tat wild-type e dei mutanti del gene tat, riportate qui di seguito sono state inserite nel vettore plasmidico pCV0 come descritto in precedenza.



Per Seq. 1 si intende la sequenza del gene tat di HIV-1, clone BH-10 e della sua proteina derivata. Per Seq. 2 si intende la sequenza del mutante cys22 (e della sua proteina derivata), rappresentata da una sostituzione del nucleotide Timina (T) in posizione 66 a partire dall'estremità 5' con il nucleotide Guanina (G). Tale sostituzione dà luogo ad una sostituzione, nella sequenza aminoacidica derivata, di una Cisteina (C in codice ad una lettera) in posizione 22 dall'estremità amino-terminale, con una Glicina (G in codice ad una lettera). Per Seq. 3 si intende la sequenza del mutante lys41 (e della sua proteina derivata), rappresentata da una sostituzione del nucleotide Timina (T) in posizione 123 a partire dall'estremità 5' con il nucleotide Citosina

(C). Tale sostituzione dà luogo ad una sostituzione, nella sequenza aminoacidica derivata, di una Lisina (K in codice ad una lettera) in posizione 41 dall'estremità amino-terminale, con una Treonina (T in codice ad una lettera). Per Seq. 4 si intende la sequenza del mutante RGD (e della sua proteina derivata), rappresentata dalla delezione della sequenza nucleotidica CGAGGGGAC, che va dal nucleotide 232 al nucleotide 240, a partire dall'estremità 5' della sequenza del gene tat

1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

wild-type. Tale delezione origina, nella sequenza aminoacidica derivata, una delezione degli aminoacidi Arginina-Glicina-Acido aspartico (RGD nel codice ad una lettera) nelle posizioni 78-80 a partire dall'estremità amino-terminale. Per Seq. 5 si intende la sequenza del doppio mutante lys41-RGD Δ (e della sua proteina derivata), un originato dalla combinazione dei mutanti sopradescritti.

Sequenza nucleotidica di tat wild-type (Seq. 1)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCC
TATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGC
AGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAATC
CCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG 3'

Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALG
ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDP TGPKE-COOH

Sequenza nucleotidica del mutante cys22 (Seq. 2)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAACTGCGGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTG
CTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCT
ATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCA
GTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAATCC
CGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3

Sequenza aminoacidica

1354PTIT

H 0 0 0 3 9 9
NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTAGTNCYCKKCCFHCQVCFITKA

LGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVLSKQPTSQSRGDPTGPKE-

CaOH

Sequenza nucleotidica lys41 (Seq. 3)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG

AAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT

GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAGCCCTTAGGCATCTCC

TATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGC

AGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAATC

CCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG

ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Sequenza nucleotidica del mutante RGDΔ (Seq. 4)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG

AAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT

GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCC

TATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGC

AGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAATC

CCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALG

ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

Sequenza nucleotidica del mutante lys41-RGDΔ (Seq. 5)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
 AAGTCAGCCTAAAGCTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
 GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTCC
 TATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGC
 AGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAATC
 CCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza aminoacidica

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG
 ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

Esempio 3. Costruzione e caratterizzazione degli immunogeni a DNA.

Le molecole di DNA per l'inoculazione degli animali sono costruite nel vettore plasmidico pCV0 di 6.4 kb [Arya et al., Science 229:69 (1985)]. Questo plasmide comprende due origini di replicazione di SV40, il "major late promoter dell'adenovirus" (AdMLP), e le sequenze di splicing dell'adenovirus e dei geni delle immunoglobuline di topo, il cDNA del gene della diidrofolato-reduttasi di topo (dhfr) e il segnale di poliadenilazione di SV40. Il sito per l'enzima di restrizione PstI è

localizzato a 3' dell'AdMLP, e rappresenta il sito in cui è clonato il gene esogeno di interesse. Il cDNA del gene tat (261 coppie di basi) (Seq. 1, esempio 2) di HIV era derivato dal ceppo BH10 [Ratner et al., Nature 313:277 (1985)] e codifica una proteina di 86 aminoacidi. Il vettore pCV-Tat [Arya et al., Science 229:69 (1985)] era ottenuto clonando nel sito PstI di pCV0 il cDNA del gene tat, che pertanto era posto sotto il controllo trascrizionale dell'AdMLP. La scelta di questo vettore si basa

sul fatto che l'AdMLP induceva una più elevata espressione e rilascio di Tat, rispetto ad altri promotori eucariotici, come, per esempio, "l'immediate early region promoter" del citomegalovirus (CMV) come dimostrato da Ensoli et al. [J. Virol. 67:277 (1993)], e riportato nella Tabella 3.

TABELLA 3.

Espressione, localizzazione subcellulare, rilascio ed attività di Tat in cellule COS-1 transfettate con pCV-Tat e CMV-Tat^a.

Vettori Espressione di Tat Contenuto di Tat^b.....Attività di Tat

CelluleNucleo^cCitoplasma^cTotaleIntracell Extracell Intracell^d Extracell.^e

Positive (%)				(%)	(%)	(fold)	(cpm)	
pCV-Tat	5-10	++	++	25	63.5	36.5	50	2,478
CMV-Tat	3-5	++	+	14.6	92.2	7.8	72	2,254
Controllo	0	-	-	0	0	0	1	1,400

^aCellule COS-1 (5×10^6) sono state trasfettate mediante elettroporazione con 30 μ g di pCV-Tat, CMV-Tat o un DNA di controllo.

Quarantotto ore dopo la trasfezione, l'espressione di Tat è stata valutata mediante immunoistochimica con anticorpi monoclonali anti-Tat (i risultati

sono riportati come media dei valori della percentuale delle cellule positive) e determinando la localizzazione di Tat nucleare e citoplasmatica. La presenza di Tat intra- ed extra-cellulare è stata analizzata mediante radioimmunoprecipitazione sugli estratti cellulari (500 μ l) e nei terreni di cultura (4 ml) e successiva lettura densitometrica (Gelscan XL; Pharmacia) delle bande di Tat precipitate. L'attività del Tat intracellulare è stata misurata su estratti cellulari di cellule COS-1

H 02 03 99


cotrasfettate con i vettori esprimanti Tat, o il vettore di controllo, ed il plasmide HIV-1 LTR-CAT; l'attività del Tat extracellulare sull'induzione della proliferazione di cellule AIDS-KS (determinata mediante saggio di incorporazione della timidina triziata) è stata misurata nel terreno di cultura (diluito 1:2 e 1:4) delle cellule trasfettate con i plasmidi esprimanti Tat o il plasmide di controllo. I risultati corrispondono alla media di 5 esperimenti indipendenti.

^bAnalisi densitometrica della banda della proteina Tat immunoprecipitata. I valori sono espressi in una scala arbitraria, essendo 10 il valore minimo totale (Tat intra- ed extracellulare) evidenziato.

C-, negativo; +, 50% di cellule Tat-positive; ++, 50-100% di cellule Tat-positive.

^dAttività CAT dopo 20 minuti di incubazione rispetto al vettore di controllo, il cui valore di attivazione è considerato uguale a 1

^eLa crescita delle cellule AIDS-KS è stata misurata mediante un saggio di incorporazione di timidina triziata (deviazione standard, DS: 12%). Il terreno delle cellule trasfettate con il DNA di controllo determinava un'incorporazione di timidina triziata pari a 1,400 cpm (DS: 11.5%). Il

terreno di cultura derivato da linfociti contenenti il virus HTLV-II (controllo positivo) determinava un'incorporazione di timidina triziata pari a 2,400 cpm (DS: 10%).

Dai risultati della Tabella 3 si osserva che nelle cellule trasfettate con pCV-Tat, rispetto alle cellule transfettate con CMV-Tat, a percentuale di cellule Tat-positive ed il contenuto totale di Tat è maggiore, la quantità

H 00.00.00
llr

di Tat rilasciata è molto più elevata e correla con il contenuto totale e citoplasmatico di Tat, e l'attività biologica di Tat extracellulare sulla crescita delle cellule AIDS-KS è conseguentemente maggiore. Questi risultati indicano che il vettore pCV-Tat codifica per una proteina biologicamente attiva, induce alti livelli di espressione del cDNA del gene tat ed è in grado di rilasciare dalle cellule quantità di Tat molto maggiori rispetto al vettore CMV-Tat.

Il vettore pCV0 è utilizzato anche per l'espressione dei geni nef, rev e gag di HIV-1 e dei geni codificanti per le citochine IL-12 ed IL-15. I cDNA dei geni nef (618 coppie di basi, ceppo NL43) [Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos, NH (1995)] e rev (348 coppie di basi, ceppo NL43) [Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos, NH (1995)], il gene gag (1500 coppie di basi, ceppo NL43) [Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos, NH (1995)], o i cDNA dei geni IL-12 [Wolf et al., J. Immunol. 146:3074 (1991)] o IL-15 [Grabstein et al., Science 264:965 (1994)] sono amplificati mediante la

tecnica della "polimerase chain reaction" (PCR) utilizzando primers specifici complementari ai primi 15 nucleotidi della regione 5' (primer forward) (Seq. P1, P3, P5, P7, P9) o agli ultimi 15 nucleotidi della regione 3' del gene (primer reverse) (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). Inoltre, ciascun primer, sia forward che reverse, include la sequenza per l'enzima di restrizione PstI in modo da consentire la clonazione dell'amplificato nel vettore pCV0. Dopo la clonazione si controlla la

sequenza dei geni inseriti mediante sequenziamento del DNA. Il vettore pCV0 è utilizzato anche per la co-espressione di Tat con altri geni virali di HIV-1 (rev, nef o gag) o con i geni delle citochine IL-12 o IL-15. A questo scopo il cDNA del gene tat di HIV-1 di 261 coppie di basi (Seq. 1, esempio 2) è amplificato mediante PCR con un primer forward che include la sequenza per l'enzima di restrizione PstI (Seq. P11) e un primer reverse complementare agli ultimi 15 nucleotidi del gene tat (Seq. P12). I geni virali (nef, rev o gag) e i geni delle citochine IL-12 o IL-15 sono amplificati con un primer forward che include inoltre una sequenza di 15 basi complementare alla regione 3' del gene tat, tale da permettere che il gene sia "in frame" con il gene tat (Seq. P13, P14, P15, P16, P17), ed un primer reverse che include la sequenza per l'enzima di restrizione PstI (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). Successivamente si esegue una terza reazione di PCR in cui il DNA template è rappresentato dagli amplificati del gene tat e del gene di interesse, il primer forward è rappresentato dal primer utilizzato per amplificare tat (Seq. P11) e il primer reverse da quello utilizzato per amplificare il gene di interesse (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). L'amplificato tat/gene di interesse è purificato in gel di agarosio, digerito con PstI e clonato in pCV0. Dopo la clonazione si controlla la sequenza dei geni inseriti mediante sequenziamento del DNA, mentre l'espressione della proteina si determina mediante trasfezione come descritto in precedenza (Ensoli et al, J. Virol. 67: 2771993).

Sono riportate le sequenze dei primers sopra menzionati.

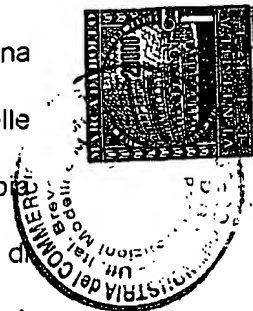
La tollerabilità, la sicurezza e la capacità di indurre una risposta immune specifica (umorale e cellulare) della proteina Tat ricombinante prodotta con il metodo descritto e purificata tramite colonne di affinità di eparina è stata valutata nel modello sperimentale dei primati non umani delle scimmie cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Per attivare un'ampia risposta immune con un vaccino proteico abbiamo usato l'idrossido di alluminio (Alum) che è stato sperimentato in numerosi modelli ed è l'unico approvato per la sperimentazione nell'uomo. Tra gli adiuvanti particolari abbiamo usato il RIBI (appartenente al gruppo degli emulsionanti e composto da lipide A monofosforilico, dimicolato trealosico e scheletro della parete batterica del bacillo di Calmette-Guerin) [Audibert et al., Immunol. Today, 14:281 (1993); Morein et al., AIDS Res. Hum. Retrov. S10:S109 (1994)].

Nel primo esperimento pilota abbiamo inoculato 3 scimmie secondo il seguente schema:

Proteina Tat ricombinante (100 µg), risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI, ed inoculata per via sottocutanea in un sito. 2)

Proteina Tat ricombinante (10 µg), risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI, ed inoculata per via sottocutanea in un sito. 3) Scimmia

di controllo non inoculata. Da tutte le scimmie erano prelevati 10 ml di sangue nei giorni -42 e -35 antecedenti la prima vaccinazione per la determinazione dei parametri di base. Campioni di sieri e di plasma sono stati congelati a -20°C o -80°C ed utilizzati successivamente per risospendere l'inoculo proteico. Le scimmie 1 e 2 erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 5, 10, 15, 22 e 27 settimane. Negli stessi giorni



1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

- Seq. P1. Primer forward Rev: 5'ATGGCAGGAAGAAGC3'
- Seq. P2. Primer reverse Rev: 5'CTATTCTTTAGTTCC3'
- Seq. P3. Primer forward Nef: 5'ATGGGTGGCAAGTGG3'
- Seq. P4. Primer reverse Nef: 5'TCAGCAGTCCTTGT3'
- Seq. P5. Primer forward Gag: 5'ATGGGTGCGAGAGCG3'
- Seq. P6. Primer reverse Gag: 5'TTATTGTGACGAGGG3'
- Seq. P7. Primer forward IL-12: 5'ATGTGGCCCCCTGGG3'
- Seq. P8. Primer reverse IL-12: 5'TTAGGAAGCATTGAG3'
- Seq. P9. Primer forward IL-15: 5'ATGAGAATTCGAAA3'
- Seq. P10. Primer reverse IL-15: 5'TCAAGAAGTGTTGAT3'
- Seq. P11. Primer forward Tat: 5'ATGGAGCCAGTAGAT3'
- Seq. P12. Primer reverse Tat: 5'CTATTCTTCGGGCC3'
- Seq. P13. Primer forward Tat/Rev: 5'GGCCCGAAGGAAATGGCA
GGAAGAAGC3'
- Seq. P14. Primer forward Tat/Nef: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGT
GGCAAGTGG3'
- Seq. P15. Primer forward Tat/Gag: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGTGCG
AGAGCG3'

Seq. P16. Primer forward Tat/IL-12: 5' GGCCCGAAGGAAATGTGGC
CCCCTGGG3'

Seq. P17. Primer forward Tat/IL-15: 5' GGCCCGAAGGAAATGAGAAT
TTCGAAA3'

**Esempio 4. Inoculazione in *Macaca fascicularis* sani di un vaccino
anti-Tat proteico: valutazione della sicurezza, tollerabilità, risposta
immune specifica.**

dell'inoculazione dell'immunogeno venivano prelevati campioni di 10 ml di sangue per eseguire gli esami di laboratorio (analisi chimico-cliniche, elettroliti, conta dei leucociti, delle piastrine, dell'emoglobina), la valutazione di parametri immunologici, quali la presenza di immunoglobuline specifiche (IgM, IgG, IgA) i livelli di citochine del tipo Th1 (IL-2, IFN γ) e Th2 (IL-4, IL-10) IL-15, la produzione di chemochine (Rantes, MIP-1 e MIP-1), il fenotipo linfocitario (CD4, CD8, CD3, CD14, CD20, CD25, CD56 e HLA-DR, CD45RA e CD45RO), la risposta proliferativa a Tat, la presenza di attività CTL e NK, e la presenza di attività antivirale mediata dalle cellule CD3+ (CAF). Inoltre, per valutare in vivo la presenza di una risposta cellulo-mediata tutte le scimmie vaccinate e quella di controllo erano sottoposte a "skin-test" per Tat. Questo esperimento pilota prevede un ulteriore richiamo di tutte le scimmie alla 32^a settimana ed infine un richiamo con la proteina Tat risospesa in Iscom (immune stimulating complex). L'Iscom è un adiuvante composto dalla saponina Quil A, colesterolo e fosfolipidi in grado di incrementare la risposta umorale e cellulare [Morein et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 10:S109 (1994); Lövgren et al., Vaccine 14:753 (1996)]. L'effetto protettivo della vaccinazione sarà quindi determinato dopo il "challenge" delle scimmie, vaccinate e di controllo, che sarà effettuato alla 41^a settimana dall'inizio della immunizzazione, inoculando per via endovenosa 10 M:ID₅₀ (50% monkey infectious doses) di "simian-human immunodeficiency virus" (SHIV) cresciuto e titolato in *Macaca fascicularis* e contenente il gene tat e/o il gene nef e

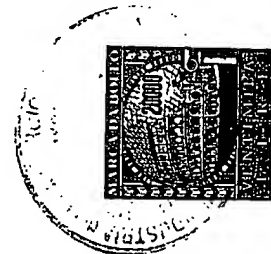
rev di HIV [Shibata et al., J. Virol. 65:314 (1991); Li et al., J. AIDS 5:639 (1992); Sakuragi et al., J. Gen. Virol. 73:2983 (1992); Li et al., J. AIDS 5:639 (1992); Igarashi et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 10:1021 (1994); Luciw et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92:7490 (1995); Reinmann et al., J. Virol. 31: 98 (1996)]. Il monitoraggio post-challenge (ogni 2 settimane a partire dal giorno del challenge per il primo mese ogni 4 settimane per i successivi 3 mesi, ed ogni 8 settimane fino a 6 mesi dal challenge) includerà anche l'analisi di parametri virologici quali la determinazione dei valori plasmatici di p27 ed il carico virale nel plasma e nelle cellule. I risultati di questo esperimento relativi alle prime 27 settimane dall'inizio del protocollo sono i seguenti. Nelle scimmie vaccinate e nel controllo non si erano osservate alterazioni significative dei parametri chimico-fisici, ematologici e comportamentali. Non erano osservati segni di infiammazione e neoformazioni vascolari nei siti di inoculazione. Questi risultati indicano che la proteina Tat era ben tollerata dagli animali e non era tossica nelle dosi somministrate, utilizzando le vie di inoculazioni scelte. Nelle scimmie 1 e 2 erano presenti anticorpi IgG specifici anti-Tat a partire dalla 5^a settimana dopo la prima inoculazione. Alla 27^a settimana IgG anti-Tat erano evidenziabili alla diluizione di 1:3200 e 1:6400 nel plasma della scimmia 1 e 2 rispettivamente. I risultati sono riportati nelle figure 2 e 3. I risultati attualmente disponibili dimostrano la comparsa di una risposta proliferativa al Tat alla 22^a settimana (Tabella 4) nelle scimmie inoculate con il Tat, essendo maggiore nella scimmia 2 che riceveva ad ogni inoculazione 10 µg di proteina Tat ricombinante.

1354PTIT

TABELLA 4

Risposta proliferativa al Tat alla 22a settimana post-immunizzazione^a

N _i scimmia	Stimolo	Indice di stimolazione
1	PHA	13,95
	TT	4,68
	Tat	2,45
2	PHA	11,57
	TT	3,77
	Tat	3,04
3	PHA	19,9
	TT	6,23
	Tat	1,38



^aLinfociti di sangue periferico isolati mediante gradiente di Ficoll e seminati a 2×10^5 cellule per pozzetto in triplicato in piastre da 96

pozzetti, erano cresciute in RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino e stimulate con Tat ($5 \mu\text{g/ml}$), PHA ($4 \mu\text{g/ml}$), o tossoide del tetano (TT) ($10 \mu\text{g/ml}$), contro cui tutti le scimmie erano vaccinate. Campioni di controllo erano incubati solo con il terreno di crescita. L'incremento della proliferazione cellulare era determinata al 5^o giorno con saggio di incorporazione di timidina triziata come descritto [Ensoli et

H 02.03.99

al., IV International Conference on AIDS, Stockholm, 1:241 (1988);

Cafaro et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 7:204 (1991)]. I risultati sono riportati come indice di stimolazione (che era calcolato secondo la seguente formula: Media dei cpm del campione/media dei cpm dei controlli. Sono considerati positivi i valori superiori a 2). Le scimmie 1 e 2 erano inoculate con la proteina Tat ricombinante (100 µg e 10 µg, rispettivamente) risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI, ed inoculata per via sottocutanea in un sito. La scimmia 3 è una scimmia di controllo non inoculata.

I risultati di questo esperimento pilota indicano che la proteina Tat ricombinante, prodotta e purificata con il protocollo da noi descritto, non era tossica alle dosi di 100 e 10 µg inoculate per via sottocutanea ed era in grado di indurre una risposta immune specifica sia umorale che cellulo-mediata. La risposta immune specifica anti-Tat era maggiore nella scimmia 2, immunizzata con 10 µg di proteina ricombinante. Inoltre, anche l'adiuvante RIBI non era apparentemente tossico negli animali.

In un esperimento iniziato successivamente abbiamo valutato l'effetto dell'immunizzazione indotta da Tat in combinazione con il RIBI o con l'Alum. Le scimmie sono state inoculate per via sottocutanea in un unico sito secondo il seguente schema. Scimmie 1-3 : 10 µg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI. Scimmie 4-6: 10 µg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di Alum. Scimmia 7: RIBI 250 µl e 250 µl di siero



autologo. Scimmia 8: Alum 250 μ l e 250 μ l di siero autologo. Da tutte le scimmie sono stati prelevati 10 ml di sangue al giorno -9, antecedente la prima vaccinazione, per potere eseguire le analisi descritte nel primo esperimento pilota e disporre dei parametri di base di ciascun animale. Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 2, 6, 11 e 15 settimane. Negli stessi giorni dell'inoculazione dell'immunogeno venivano prelevati campioni di 10 ml di sangue per eseguire gli esami descritti nel primo esperimento pilota. Inoltre, sono prelevati campioni di urine ed eseguiti tamponi vaginali sui quali sarà determinata la presenza di IgA secretorie specifiche. Questo esperimento pilota prevede due richiami alla 21^a e 26^a settimana delle scimmie 1-6 con l'immunogeno proteico ed adiuvanti e delle scimmie 7 e 8 con solo gli adiuvanti. Infine, verrà eseguito un ultimo richiamo alla 31^a settimana con la proteina Tat risospesa in Iscom. L'effetto protettivo della vaccinazione sarà quindi determinato dopo il challenge delle scimmie, vaccinate e di controllo, che sarà effettuato alla 40^a settimana dall'inizio dell'immunizzazione, inoculando per via endovenosa 10 MID50 di SHIV. Il monitoraggio post-challenge verrà eseguito come descritto per il primo esperimento pilota.

I risultati del secondo esperimento pilota, attualmente disponibili e relativi alla 15^a settimana dall'inizio della vaccinazione, sono i seguenti. Negli animali non si osservavano alterazioni significative dei parametri chimico-fisici, ematologici e comportamentali. Le scimmie non presentavano infiammazione o segni di neovascolarizzazione nei siti di inoculazione. E' stata dimostrata la presenza di una risposta anticorpale

H 02.03.99

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

1354PTIT

(IgM, IgG) specifica. Alla 15^a settimana i titoli anticorpali (IgG) anti-Tat raggiungevano valori elevati e variabili da 1:12.800 a titoli maggiori di 1:50.000 (figure 4-6). Inoltre l'attività neutralizzante il Tat del siero delle scimmie vaccinate veniva saggiata mediante saggi di inibizione del "rescue" dell'infezione virale in cellule HLM-1 trattate con la proteina Tat esogena, come precedentemente descritto [Ensoli et al., J. Virol. (1993)]. Tali saggi hanno dimostrato che i sieri delle scimmie M1-6 diluiti 1:2 ottenuto alla 15^a settimana dal primo inoculo erano in grado di bloccare la replicazione virale indotta da Tat esogeno, misurata tramite determinazione dell'antigene p24 nel sopranatante delle cellule, mentre il siero delle stesse scimmie al tempo 0 (preimmune) o i controlli negativi non avevano attività bloccante verso il Tat (TABELLA 5).

TABELLA 5

Attività neutralizzante degli anticorpi anti-Tat sul "rescue" dell'infezione virale indotta da Tat extracellulare.

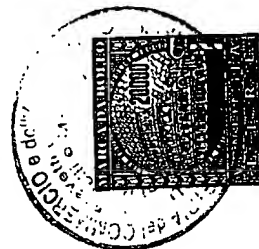
Campioni	HIV-1 p24 (pg/ml)
Tat	61.38
Tat + Siero preimmune M1	46.80
Tat + Siero preimmune M2	22.96
Tat + Siero preimmune M3	96.98
Tat + Siero preimmune M4	126.68
Tat + Siero preimmune M5	27.03
Tat + Siero preimmune M6	78.61
Tat + Siero immune M1	4.77

H 02.03.99

1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

Tat + Siero immune M2	4.88
Tat + Siero immune M3	Neg.
Tat + Siero immune M4	Neg.
Tat + Siero immune M5	7.88
Tat + Siero immune M6	4.55
Pool M1-6 (controllo preimmune)	Neg.
Pool M1-6 (controllo immune)	Neg.
PBS + 0.1% BSA	Neg.



L'attività neutralizzante degli anticorpi anti-Tat è stata determinata in cellule HLM-1 (cellule HeLa contenenti integrata una copia del provirus HIV-1 difettivo del gene tat). Cellule HLM-1 sono state piastrate alla concentrazione di 6×10^5 /pozzetto in piastre da 24 pozzetti ed incubate a 37°C per 16 ore. Le cellule sono state lavate 2 volte con PBS contenente albumina sierica bovina (BSA) allo 0.1%, ed incubate per 48 ore con terreno di crescita (0.3 ml) a cui veniva aggiunta la proteina Tat ricombinante (30 ng/ml) da sola o in presenza di un ugual volume di siero (diluito 1:2) delle scimmie prelevati al tempo 0 (sieri preimmuni) o alla 15ª settimana (sieri immuni). I controlli erano rappresentati dalle

cellule trattate solo con un pool dei sieri preimmuni, immuni, o con PBS contenente BSA allo 0.1% (PBS + 0.1% BSA) ma in assenza di Tat. Ogni campione è stato saggiato in doppio. Sui supernatanti cellulari era quindi determinata la presenza di virus rilasciato dalle cellule mediante determinazione dei valori di antigene p24, utilizzando un kit commerciale p24 antigene capture - Elisa (Nen Dupont). I risultati sono espressi come

H 02.03.99

1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

valori di p24 (pg/ml) presenti nei terreni e corrispondono alla media dei valori ottenuti dai due pozzetti per ciascun campione.

Alla 11^a settimana era inoltre evidente una risposta proliferativa specifica al Tat nelle scimmie 2 e 3 inoculate con la proteina Tat ed il RIBI e nella scimmia 4 inoculata con la proteina Tat e l'Alum che aumentava alla 15^a settimana (Tabella 5).

1354PTIT

H 02.03.88
 NOTARBARCOLO & GERVASI S.p.A. *WZ*

TABELLA 6.

Risposta proliferativa al Tat^a

N° scimmia	Stimolo	Settimane dell'inizio della immunizzazione			
		0	3	11	15
1	PHA	16,96	22,83	10,50	15,27
	TT	11,69	2,16	1,96	3,01
	Tat	1,12	1,94	1,55	0,52
2	PHA	31,27	29,37	25,75	21,28
	TT	1,12	2,16	1,8	0,57
	Tat	1,08	2,05	3,65	6,22
3	PHA	22,42	39,15	7,89	16,88
	TT	11,43	1,72	0,95	1,71
	Tat	1,65	1,44	2,69	18,82
4	PHA	3,88	13,85	20,77	15,22
	TT	2,85	3,90	4,49	9,07
	Tat	1,29	1,88	3,01	3,24
5	PHA	6,50	11,39	5,74	16,74
	TT	2,31	3,22	1,07	4,84
	Tat	1,80	1,02	0,66	1,76
6	PHA	11,96	7,01	17,94	2,77
	TT	4,14	5,01	1,71	0,13
	Tat	1,37	2,47	1,06	0,11
7	PHA	21,65	25,20	20,30	37,93
	TT	0,97	1,30	0,80	0,88

H 00.00.00

1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

	Tat	1,78	1,12	0,68	0,73
8	PHA	26,51	21,44	67,09	16,38
	TT	1,20	2,03	10,78	0,20
	Tat	1,12	0,97	0,00	0,21

^aLinfociti di sangue periferico isolati, piastrati e cresciuti come descritto, venivano stimolati con PHA (4 µg/ml), il tossoide tetanico (TT) e Tat (5 o 1 µg/ml) e saggiati, come descritto in Tabella 4. Le scimmie 1-3 erano inoculate con 10 µg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di RIBI; 3 scimmie 4-6 erano inoculate oppure con 10 µg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 µl di siero autologo e 250 µl di Alum; due scimmie di controllo venivano inoculate con RIBI (250 µl e 250 µl di siero autologo)(scimmia 7) e con Alum (250 µl e 250 µl di siero autologo)(scimmia 8).

Inoltre, alla 15^a settimana 5 scimmie inoculate con la proteina ricombinante (scimmie 2-6) reagivano allo skin test, ulteriormente indicando la presenza di una risposta cellulo-mediata evidenziata da una forte reazione di ipersensibilità ritardata (Tabella 7 e figura 7).

H 02.03.99

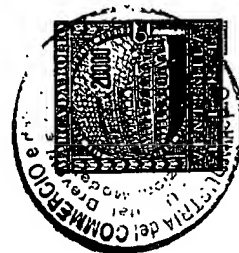
1354PTIT

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

TABELLA 7.

Skin-test al Tat^a

	Settimane dall'inizio dell'immunizzazione	
N° scimmie	11	15
1	-	-
2	-	+
3	-	+
4	-	+
5	+	+
6	-	+
7	ND	ND
8	ND	ND



^aTat (5, 1 e 0.2 µg) in 150 µl di PBS-0.1% BSA ed il suo tampone venivano inoculati per via intradermica in un'area tricotomizzata del dorso degli animali vaccinati ma non nei controlli (ND, non determinato) all'11^a ed alla 15^a settimana dopo il primo inoculo vaccinale. La comparsa di eritema dopo 24, 48 o 72 ore veniva considerata come risposta positiva.

Questi risultati indicano che l'immunogeno, nonché entrambi gli adiuvanti RIBI e alum, erano ben tollerati dagli animali e non erano tossici, confermando i risultati relativi alla sicurezza e tollerabilità della vaccinazione con Tat ottenuti nel primo esperimento pilota. Inoltre, questi dati confermano l'osservazione riportata nel primo esperimento

H 02.03.99

1354PTIT

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

ovvero che la proteina ricombinante Tat induce una forte risposta umorale e cellulare specifica anti-Tat in vitro e in vivo.

Esempio 5. La costimolazione con biglie anti-CD3/28 di linfociti CD4+ purificati da scimmie infette con SIV+ induce l'espansione logaritmica del numero delle cellule in assenza di significativa replicazione e propagazione dei virus.

Le cellule del sangue periferico sono state deplete della sottopopolazione CD8 mediante l'impiego di biglie paramagnetiche anti-CD8 (Dynal, Oslo; Dynabeads M-450 CD8) e la purezza delle popolazioni ottenute è stata valutata tramite l'analisi citofluorimetrica e considerata accettabile se maggiore del 95%. Le cellule CD8 deplete (denominate CD8⁻PBMC) sono state messe in coltura e stimolate con PHA (2 µg/ml) e IL-2 (40 U/ml) o con biglie paramagnetiche previamente coniugate con due anticorpi monoclonali specifici per gli antigeni CD3 (Clone FN18, Biosource) e CD28 (Clone 9.3, omaggio del Dr. Carl June) (biglie anti-CD3/28). Allo scopo di facilitare il legame con le biglie anti-CD3/28 l'incubazione è avvenuta su un dispositivo rotante e le cellule coniugate, selezionate con l'ausilio di un magnete, sono state

denominate CD8⁻CD3⁺CD28⁺ e poste in coltura. La concentrazione delle cellule è stata riportata a quella di partenza 3 volte a settimana ed è stata aggiunta IL-2 ove indicato; inoltre per quanto riguarda le cellule stimulate con biglie anti-CD3/28, esperimenti preliminari hanno dimostrato la convenienza dell'utilizzo di un regime di stimolazione continua ripristinando il rapporto ottimale biglie/cellule ad ogni conta

eseguita. Nostri studi hanno infatti dimostrato che in assenza di IL-2 esogena la sottopopolazione CD8-CD3+CD28+ prolifera significativamente meglio delle cellule CD8⁺PBMC in risposta alla costimolazione con biglie anti-CD3/28 e che l'aggiunta di IL-2 (40 U/mL, 3 volte alla settimana) migliora significativamente la cinetica di proliferazione sia per durata che per numero di cellule ottenute (figura 8).

Allo scopo di valutare l'attività antivirale, cellule CD8-CD3+CD28+ purificate da 4 animali SIV⁻ sono stati infettate al giorno 0 con 0.1 M.O.I. di SIV e mantenute in condizioni di stimolazione continua; come controllo sono stati impiegati CD8⁺PBMC stimolati con PHA e IL-2. L'andamento dell'infezione è stato monitorato mediante determinazione dell'antigene virale p27gag nei sovrantanti delle colture utilizzando un kit ELISA commerciale (Coulter, Hialeah, FL). I livelli di p27 (ng/ml) misurati al giorno 6 e 12 post infezione e riportati in Figura 9 hanno indicato una netta differenza fra le due condizioni di stimolazione in termini di produttività dell'infezione. Infatti al giorno 6 la riduzione percentuale della p27 rispetto ai campioni stimolati con PHA e IL-2 era

compresa fra il 40% e l'87% e al giorno 12 tale riduzione era incrementata in 2 soggetti su 4 suggerendo una minore permissività delle cellule all'infezione virale. In un solo caso (mk 9401) abbiamo registrato la propagazione dell'infezione anche nella condizione di stimolazione con biglie anti-CD3/28. I risultati descritti dimostrano che il *Macacus fascicularis* rappresenta un buon modello per la espansione ex

vivo di sottopopolazioni linfocitarie in assenza di significativa replicazione virale mediante costimolazione con biglie anti-CD3/28 e costituisce il razionale per un vaccino terapeutico basato sulla espansione e reinfusione, in soggetti infetti con HIV, di linfociti autologhi specifici per gli antigeni virali proposti.

Esempio profetico 6. Inculazione in *Macaca fascicularis* di un vaccino anti-Tat a DNA.

E' proposta l'inoculazione diretta del DNA del plasmide pCV-Tat, contenente il cDNA del gene tat wild-type, e pCV0 come DNA di controllo. I DNA plasmidici da somministrare agli animali, sono amplificati in batteri E.Coli (ceppo DH5) secondo procedure standard [Molecular cloning - A Laboratory manual; Eds. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1992)] e secondo protocolli stabiliti dalla "European Agency for the evaluation of medicinal products: Human Medicine Evaluation Unit" (Technical Report Series No. 17 January 1997), purificati mediante due gradienti di CsCl e dializzati per 48-72 ore contro 100 volumi di PBS (senza Ca++ e Mg++) sterile. I DNA sono controllati mediante

digestione con enzimi di restrizione, i cui siti di taglio sul DNA plasmidico sono noti, e la loro funzionalità controllata mediante transfezione di 5-10 µg di DNA con la tecnica del fosfato di calcio [Molecular cloning - A Laboratory Manual; Eds. Maniatis t., Fritsch E.F., Sambrook J., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1992)] in cellule H3T1 (1×10^6), che derivano da cellule HeLa contenenti integrato una copia del plasmide reporter HIV-1 LTR-CAT, e

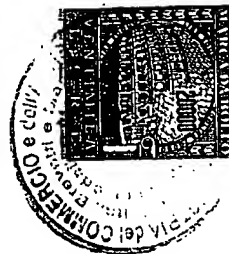
1354PTIT

H 02.03.99
NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

48 ore dopo determinazione dell'attività dell'enzima CAT [Gorman et al. Mol. Cell. Biol. 2:1044 (1982)].

I DNA di pCV-Tat o di pCVO (0.5-2 mg) risospesi in soluzione fisiologica saranno inoculati per via intramuscolare in due siti. 2-5 giorni prima della vaccinazione, gli animali verranno inoculati con 1 ml di soluzione fisiologica contenente lo 0.5% di bupivacaina e lo 0.1% di metilparabene nei due siti, opportunamente marcati, in cui successivamente verrà eseguita la vaccinazione, per aumentare l'uptake e l'espressione del DNA nel muscolo [Danko et al., Vaccine 12:1499 (1994); Fine et al., Ann. Plast. Surg. 20:6 (1988)]. Le scimmie saranno inoculate al tempo 0 e dopo 5, 10, 15, 22 e 27 settimane. Infine alla 32^a settimana sarà eseguito un richiamo con la proteina Tat ricombinante (10 µg) in presenza di Iscom. Gli animali saranno osservati giornalmente per quello che riguarda i parametri clinici come descritto nell'esempio 4. Inoltre si preleveranno campioni di 10 ml di sangue prima dell'inizio della immunizzazione e negli stessi giorni della inoculazione come descritto nell'esempio 4. L'effetto protettivo della vaccinazione sarà determinato dopo il "challenge" delle scimmie, che

sarà attenuato alla 41^a settimana dall'inizio della immunizzazione, inoculando per via endovenosa 10 MID50 di SHIV. Il monitoraggio post-challenge sarà effettuato come descritto nell'esempio 4. Saranno valutati anche protocolli di immunizzazione in cui saranno inclusi combinazioni dei DNA esprimenti gli altri geni di HIV-1 e/o citochine, descritti nell'esempio 3.



I DNA di plasmidi pCV0 e pCVTat possono essere inoculati negli animali utilizzando altri sistemi di "delivery" che potrebbero rendere più efficace l'immunizzazione, quali l'uso di liposomi, nanoparticelle o "gene gun".

Esempio profetico 7. Uso delle cellule dendritiche

I precursori di cellule dendritiche saranno isolati dal sangue periferico di primati non umani appartenenti alla specie *Macaca fascicularis* mediante coltura in vitro di cellule aderenti con GM-CSF e IL-4 per 7-14 giorni. L'analisi morfologica e la caratterizzazione fenotipica (FACS analisi e immunoistochimica dopo cytopspin) verranno condotte per confermare la identità delle cellule ottenute in coltura. L'analisi funzionale si baserà sulla capacità delle cellule isolate di indurre la proliferazione di linfociti allogenici, caratteristica distintiva delle cellule dendritiche.

Le cellule dendritiche risospese alla concentrazione di $1 \times 10^5 / 100 \mu\text{l}$ in RPMI 1640 contenente il 5% di siero autologo, 10 mM di HEPES buffer, 100 U/ml. di penicillina-streptomina, 0.5 mg/ml di amfotericina B, e glutammina allo 0.03% saranno incubate per 2 ore a 37°C in presenza di Tat o di suoi peptidi o delle combinazioni Tat, Rev, Nef, Gag e/o citochine e successivamente inoculate 2 o più volte a distanza di 2-4

settimane per via endovenosa. Alternativamente, le cellule dendritiche verranno trasdotte con vettori contenenti il gene tat da solo o associato con gli altri vettori summenzionati e successivamente inoculate endovena.

Esempio Profetico 8. Vaccinazione terapeutica

Per stabilire l'efficacia di una vaccinazione terapeutica anti-Tat, sia

un repentino cambiamento del quadro clinico. Campioni di PBMC, siero, plasma ed urine verranno congelati ad ogni controllo per successive valutazioni come descritto in precedenza.

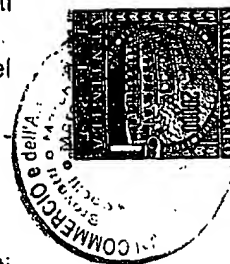
Gli immunogeni descritti saranno utilizzati per indurre e/o potenziare una risposta immune specifica a livello delle mucose. Uno degli approcci che verrà utilizzato si basa sull'uso di batteri (*Streptococcus*

H.D.O.M.E.

gordonii, commensale della cavità orale dell'uomo) "ingegnerizzati" ad esprimere gli antigeni virali sopra menzionati. Questi batteri sono in grado di colonizzare la mucosa orale e vaginale nei topi, e di indurre una risposta anticorpale specifica locale e sistemica nei confronti degli antigeni eterologhi espressi sulla superficie dei batteri ricombinanti [Oggioni et al., Vaccine 13: 775 (1995); Medaglini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6868 (1995); Medaglini et al., Vaccine 1997, in press]. L'inventore ritiene che questo metodo possa essere utilizzato con successo per indurre nelle scimmie cynomolgus l'immunizzazione specifica anche per via vaginale. Alternativamente l'immunità mucosale può essere indotta con gli immunogeni proteici descritti sopra, utilizzando altri sistemi di "delivery" batterici e non quali le citofectine ed i liposomi, e le vie di inoculazione che sono in grado da indurre la più efficace risposta immune e protettiva [Lewis et al., Vaccine Press, Ed. Robinson, Farrar, Wiblin: Human Press, Totowa, New Jersey (1996); Lehen et al., Vaccine Research 1:319 (1992); Honeribang et al., Infect. Immun. 62:15 (1994)].

RIVENDICAZIONI

1. Vaccino contro l'AIDS , i tumori e le sindromi insorgenti nei soggetti infettati da HIV-1 comprendente proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta).
2. Vaccino secondo la riv. 1 in cui le proteine o i peptidi e mutanti sono combinati con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag.
3. Vaccino secondo la riv. 1 in cui le proteine o i peptidi e mutanti sono combinati con le citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15.
4. Vaccino a DNA contro l' AIDS, i tumori e le sindromi insorgenti nei soggetti infettati da HIV-1 comprendente molecole o frammenti di DNA codificanti per Tat wild-type o per i mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta), dette molecole o frammenti di DNA essendo inseriti nel vettore plasmidico pCVC. 0
5. Vaccino secondo la riv. 4 in cui le molecole o frammenti di DNA sono combinati con molecole o frammenti di DNA dei geni nef, rev e gag.
6. Vaccino secondo la riv. 4 in cui le molecole o frammenti di DNA sono combinati con molecole o frammenti di DNA delle citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15.
7. Impiego di proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta) o relative combinazioni con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag, o relative combinazioni con citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15 per



1354PTIT

NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

immunizzare cellule dendritiche autologhe indotte ad esprimere gli antigeni corrispondenti.

8. Impiego di proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta), o relative combinazioni con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag, o relative combinazioni con le citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15 per realizzare farmaci o vaccini per immunizzare cellule dendritiche autologhe trasdotte con vettori eucariotici contenenti dette proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e i suoi mutanti e relative combinazioni.
9. Impiego secondo le riv. 7 e 8 per realizzare farmaci o vaccini per immunizzazione a livello mucosale.
10. Impiego di proteine ricombinanti o peptidi del Tat wild-type e dei suoi mutanti (cys22, lys41, RGDdelta e lys41-RGDdelta), o relative combinazioni con proteine o peptidi di Nef, Rev o Gag, o relative combinazioni con le citochine immunomodulatrici di IL-12 e IL-15 per realizzare farmaci o vaccini per immunizzare cellule del sangue periferico tramite co-stimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28.

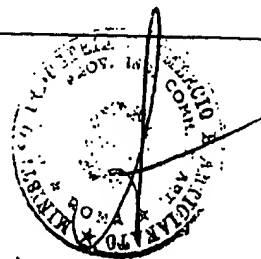
/PV Roma,

per Ensoli Barbara

il Mandatario

Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri

della NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.



H 02.03.98

Vittorio
NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

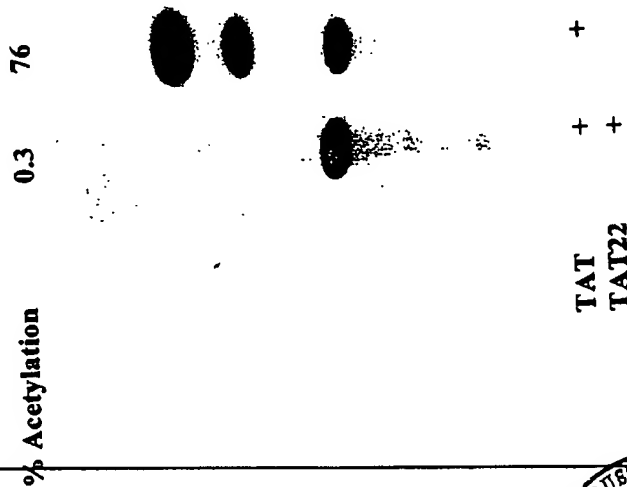


Fig.1



NOTAR BARTOLO & GERVAISI S.A.
Mar Vito

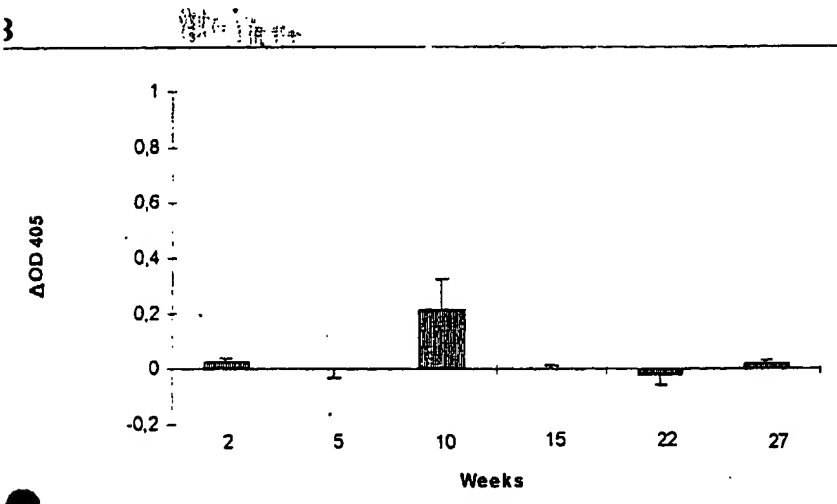
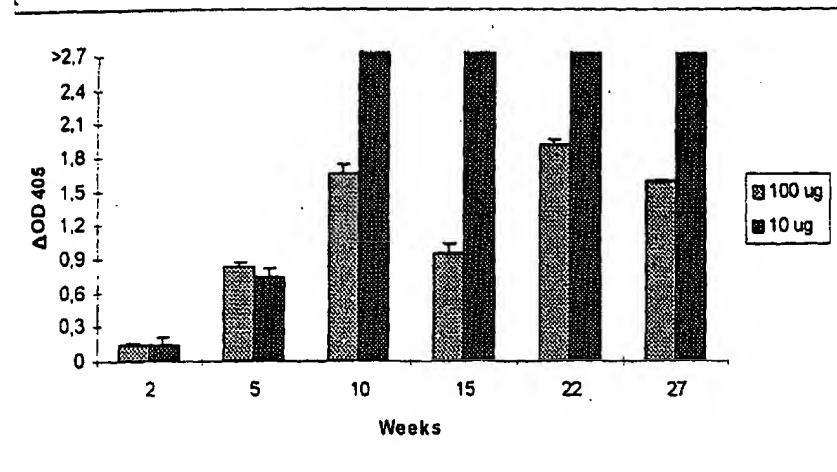


Fig.2

UFFICIO INDIRIZZO

H 0 0 0 0 0 0

NOTARBAATOLO & GERVASI S.p.A.
Mario Vittorio

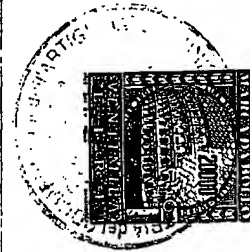
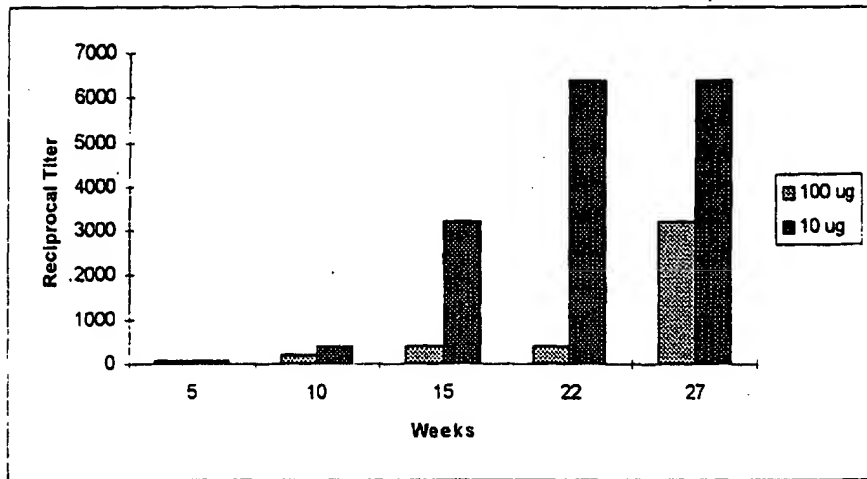


Fig.3

[Signature]

N 02.03.99

NOTAR BARTOLO & GERVAISI S.p.A.

More Vittorio

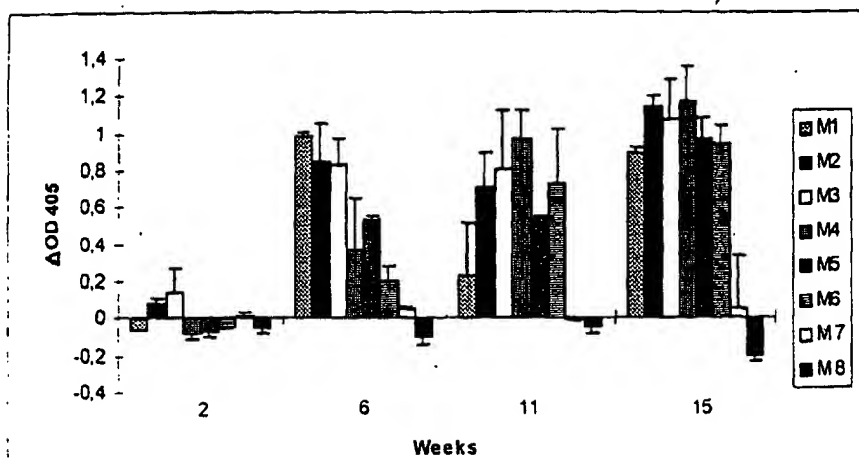


Fig.4

[Signature]

More Vittorio

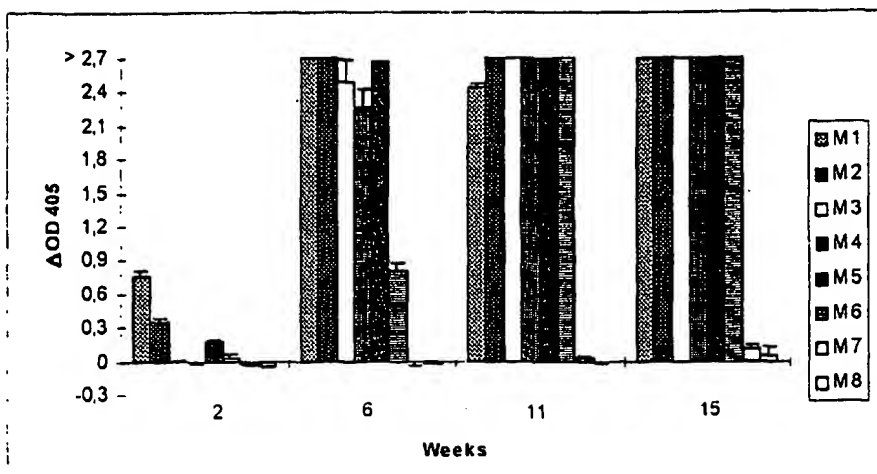
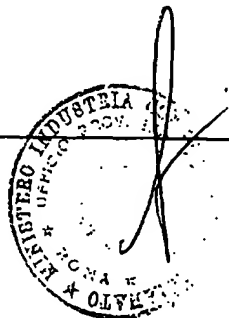


Fig.5



More than just

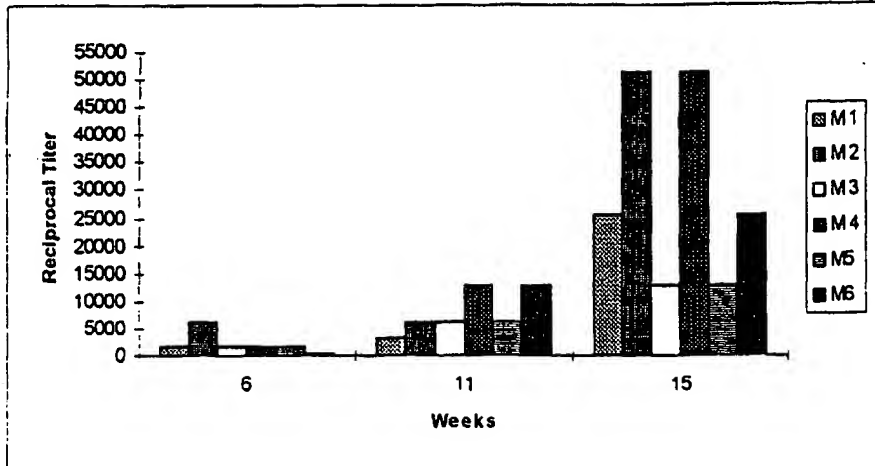


Fig.6



NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.
Alm. Vittor. S.

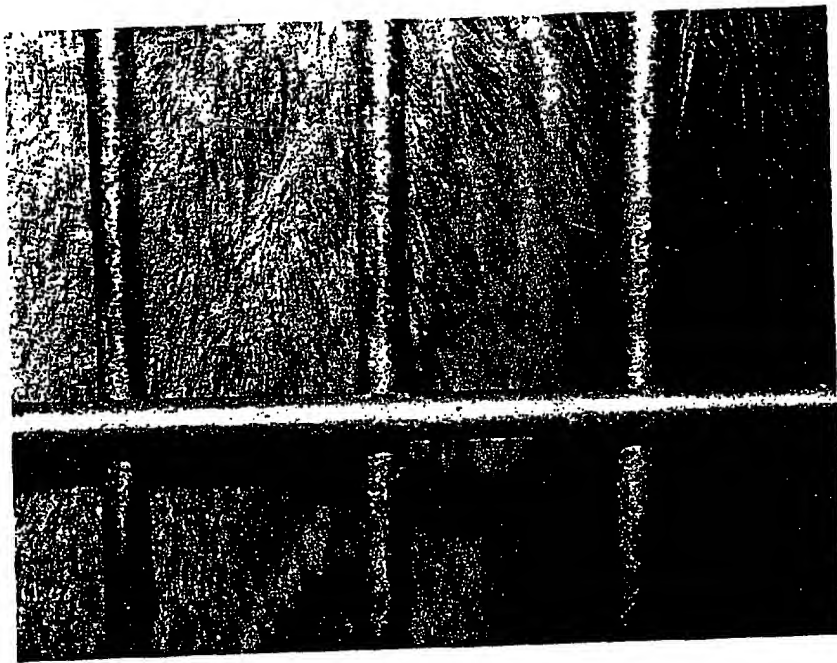


Fig. 7



H 00.03.99

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

Massimo Gervasi

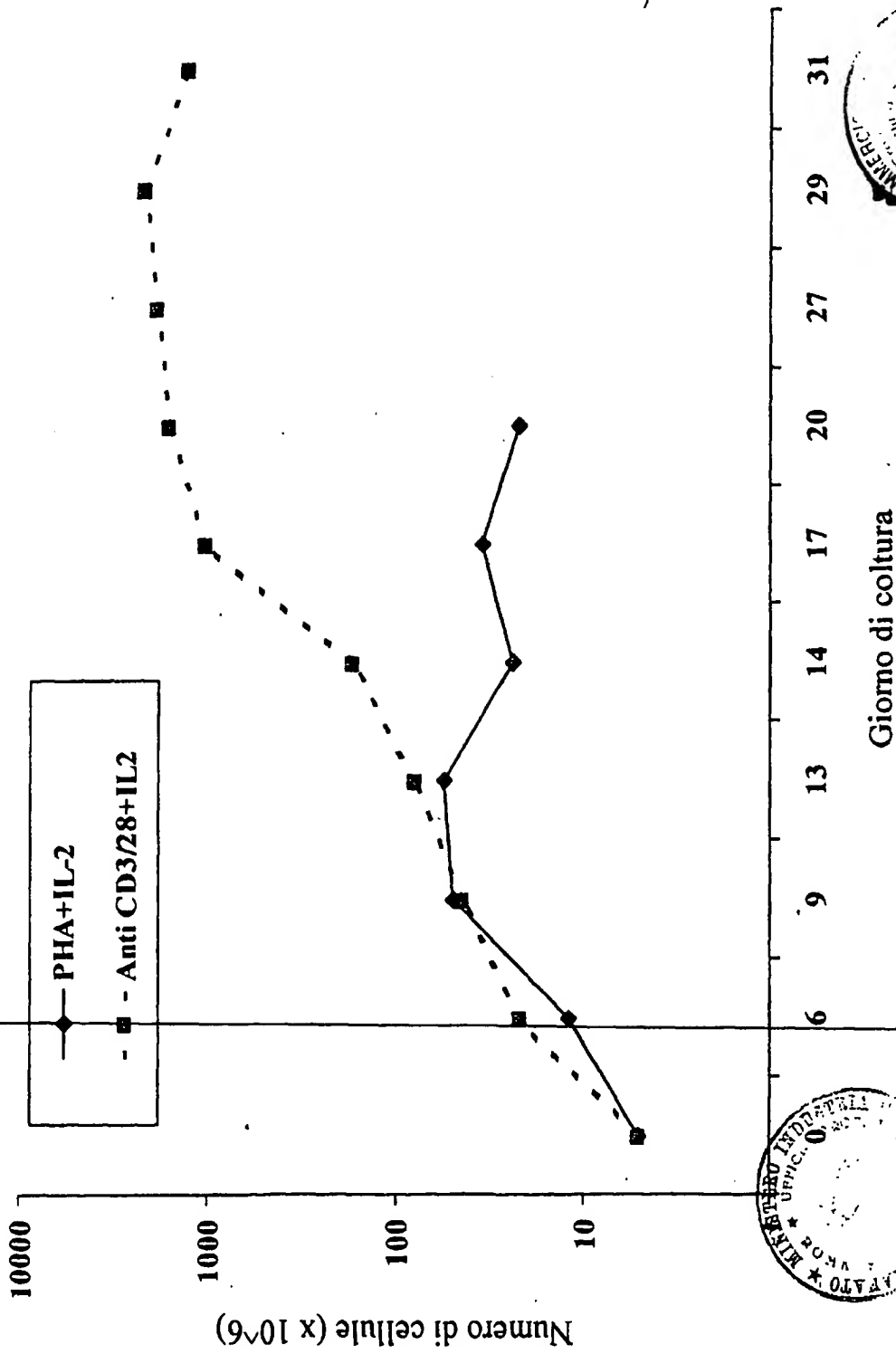
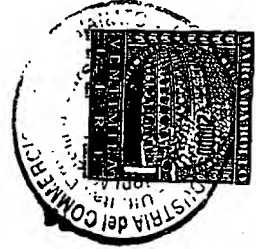
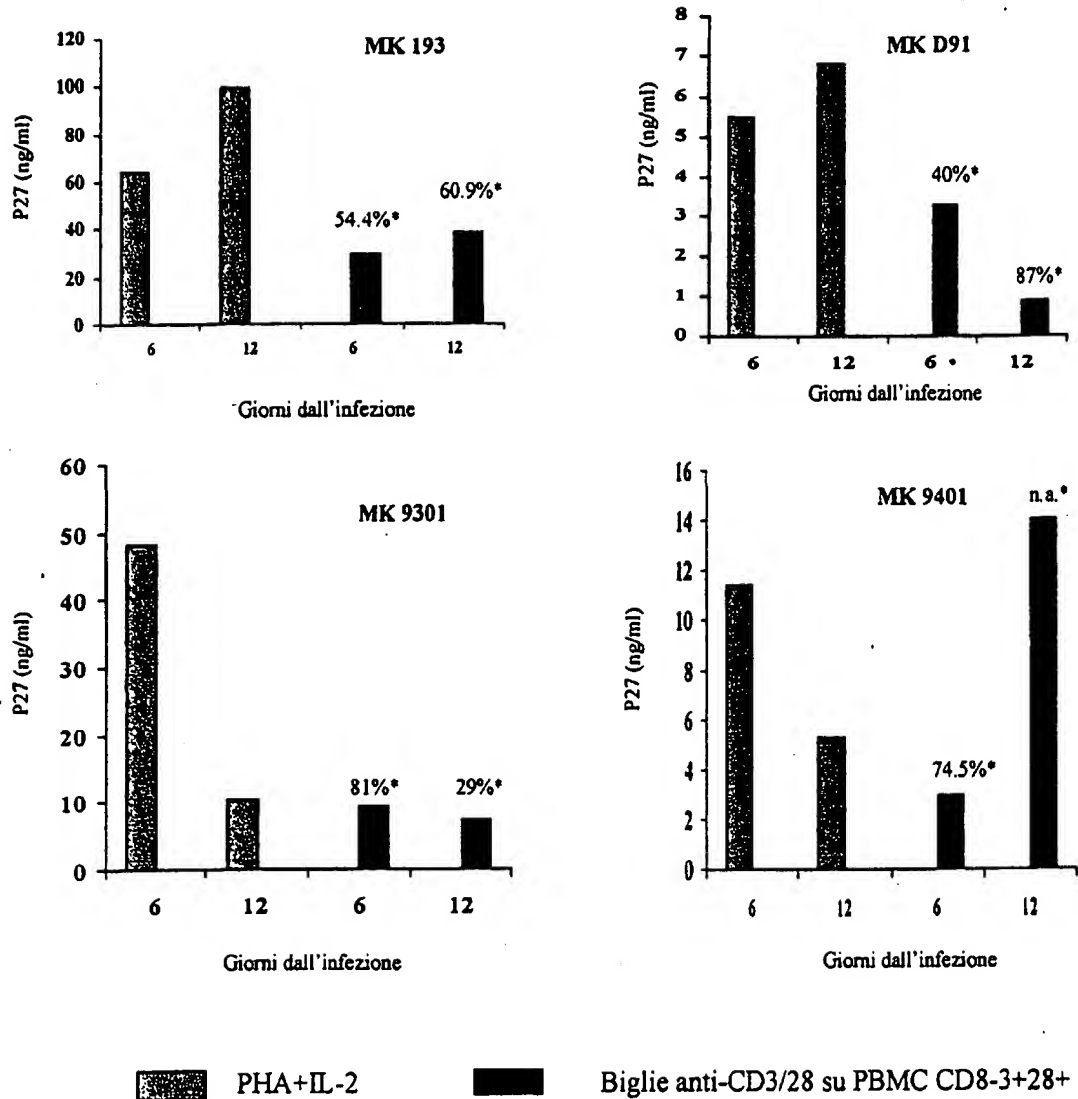


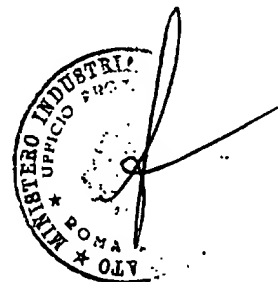
Figura 8





*) : Percentuale di inibizione.

Figura 9



H 0 0 0 0 0 0

MINISTERO DELL'INDUSTRIA COMMERCIO ED ARTIGIANATO
Ufficio Centrale Brevetti - ROMA

ISTANZA PER LA PRESA IN CARICO DI UNA INVENZIONE
Il sottoscritto ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA' di
nazionalità italiana, con sede in ROMA, a mezzo
Mandatario Dr.a MARIA VITTORIA PRIMICERI (albo n.
465) della NOTARBARTOLO & GERVASI SpA, Via
Savoia, 82, Roma, presso cui elegge domicilio a
tutti gli effetti di legge, attuale titolare della
domanda di brevetto per invenzione industriale n.
RM 97 A 000743 del 01.12.1997 a nome di Ensoli
Barbara, ma ceduto a Istituto Superiore di Sanità
con verbale di deposito di nota di trascrizione
(protocollo n. MIE000907 del 05.08.1998), fa
domanda a codesto Ministero affinché venga
registrata la presa in carico della domanda di
brevetto per invenzione industriale per
l'espletamento di qualsiasi ulteriore pratica
relativa alla domanda sopra identificata da parte
della NOTARBARTOLO & GERVASI SpA, Via Savoia, 82
Roma, in base agli articoli 93 e 94 R.D.
29.06.1939 come modificati dal D.P.R. 22.6.79 n.
338.
Si allega:



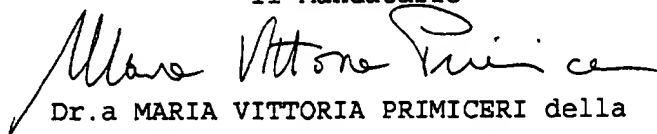
H 02.03.99

- lettera d'incarico
- fotocopia del verbale di deposito di nota di trascrizione
- fotocopia dell'atto di cessione del 03.06.1998

Roma, 15 Ottobre 1998

p. ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

Il Mandatario


Dr.a MARIA VITTORIA PRIMICERI della

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A

1354PTIT

ITALIA

H 02.03.99
ITALY

LETTERA D'INCARICO

POWER OF ATTORNEY

Numero della domanda

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

I /la sottoscritt / The undersigned

Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma

con sede/residing at

Incarica

Authorizes

Gemma Gervasi (n. 238 BM), Diego Pallini (n. 484 BM), Angelo Passini (n. 73 BM),
Giorgio Coggi (n. 148 BM), Giorgio Moretti (n. 206 BM), Giulio Mariani (n. 329 BM),
Maria Vittoria Primiceri (n. 465 BM), Livio Brighenti (n. 475 BM), Raffaella Asensio (n. 504 BM),
Cristina Cazzetta (n. 575 M), Roberto Ramponi (n. 715 M), Antonio Nesti (n. 792 BM),
Franco Oriti (n. 793 M), Paolo Gerli (n. 814 B)

della società **Notarbartolo & Gervasi S.p.A.**, di agire come propri mandatari, con firma libera e disgiunta, per il deposito in Italia presso il Ministero dell'Industria, del Commercio e dell'Artigianato (Ufficio Italiano Brevetti e Marchi) o presso uno degli Uffici Provinciali dell'Industria Commercio e dell'Artigianato, di una domanda di

per la presa in carico della domanda di Brevetto per Invenzione Industriale n. RM97A000743 del 01.12.1997

of **Notarbartolo & Gervasi S.p.A.**, to act as representatives (individually and collectively) to file in Italy, by the Ministry of Industry, Trade and Craftmanship (Italian Patent and Trademark Office) or by the competent receiving Section of the Italian Chamber of Commerce, an application for

e di fare quant'altro occorra per l'accoglimento della domanda stessa e per il riconoscimento dei diritti e delle facoltà che da essa derivano nei rapporti col Ministero dell'Industria, del Commercio e dell'Artigianato (presentazione di documenti, pagamento di tasse, richieste di certificati e di copie autentiche, richieste di rimborsi e riscossioni delle somme ammesse a rimborso, modificazioni o ritiro della domanda, ritiro degli attestati rilasciati e dei documenti relativi, presentazione e documentazione del ricorso alla Commissione di cui all'art. 71 del R.D. 29 giugno 1939, n. 1127). A tale scopo sottoscritt elegg domicilio presso la società **Notarbartolo & Gervasi S.p.A.** - Corso di Porta Vittoria, 9 - 20122 Milano, Italia, alla quale pertanto verranno fatte direttamente dal Ministero dell'Industria, del Commercio e dell'Artigianato tutte le comunicazioni, nonché le richieste e tutte le consegne di documenti che si rendessero necessarie.

and to do whatever else may be necessary to have the application accepted and to obtain acknowledgement of the rights and powers deriving therefrom in connection with the Ministry of Industry, Trade and Craftmanship (filing of documents, payment of taxes, requests of documents and certified copies, applications for refund and collection of moneys admitted to be refunded, amending or withdrawing of the application, receiving the letters patents when granted and documents relating to same, filing and arguing appeals to the Commission provided for by Art. 71 of Royal Decree 29th June 1939, n. 1127). For this purpose the undersigned elect domicile at **Notarbartolo & Gervasi S.p.A.** - Corso di Porta Vittoria, 9 - 20122 Milano, Italy, where the Ministry of Industry, Trade and Craftmanship will address directly all communications as well as all requests and deliver all documents that may become necessary.

15 OTT. 1998

Il Direttore dell'Istituto
Superiore di Sanità
(Prof. Giuseppe Benagiano)

Data/Date

Firma/Signature

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

Il Mandatario/ Patent Attorney

08-08-88 15:20

Da- NOTARBARTOLO & GERVASI

+039253179920 T-666 P.02/88 P-980



MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

Ufficio Provinciale Industria Commercio e Artigianato di Milano

SERVIZIO DEI BREVETTI PER INVENZIONI, MODELLI E MARCHE
VERBALE DI DEPOSITO DI NOTA DI TRASCRIZIONE

L'anno 1998 il giorno CINQUE del mese di AGOSTO

la Ditta ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

~~XXXXXX~~

con sede in ROMA, VIALE REGINA ELENA N.299 - ITALIA

~~XXXXXXXXXX~~

a mezzo mandatarî: DR. DIEGO PALLINI (ALBO N.484) ED ALTRI

ed elettivamente domiciliatî agli effetti di legge a Milano, presso CORSO DI PORTA VITTORIA N.9

presso NOTARBARTOLO & GERVASI S.P.A.

ha presentato a me sottoscritto:

1) Nota di trascrizione, sotto forma di domanda, in duplo, riferentesi

al brevetto per INVENZIONE NO.RM97A000743 DEL 01.12.1997.

domanda di brevetto n.

BREV.MI-E
0009072) Lettera d'incasso - ~~XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX~~3) Versamento c/c postale n.00668004 intestato all'Ufficio registro tasse e concessioni di Roma di L. 120.000.=-
emesso dall'Ufficio di _____ in data _____

4) Atto da trascrivere COPIA AUTENTICA ATTO DI CESSIONE, SOTTOSCRITTO PER LA CEDENTE PERSONALMENTE DALLA SIG.RA BARBARA ENSOLI E SOTTOSCRITTO PER LA CESSIONARIA DAL SIG.R.R.DI GIACOMO, LE CUI FIRME SONO STATE AUTENTICATE DAL DR.G.FIORIDI, NOTAIO IN ROMA IL 24.04.98. DETTO ATTO È STATO REGISTRATO IN DATA 12.05.1998, ALL'UFFICIO DEL REGISTRO DI ROMA.

SPAZIO RISERVATO ALL'UFFICIO CENTRALE BREVETTI

Atto di CESSIONE trascrizione n. _____

a carico di BARBARA ENSOLI RESIDENTE IN ROMA, VIA FOSTO AVIENO 176 - ITALIA.

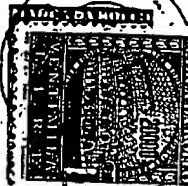
a favore di ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA' CON SEDE IN ROMA, VIALE REGINA ELENA N.299 - ITALIA.

Brevetto per INVENZIONI ~~XXXXXXXXXX~~ ~~XXXXXXXXXX~~

BREVETTO NO.RM97A000743 DEL 01.12.1997.

La nota di cui sopra è stata da me controfirmata e bollata col timbro d'ufficio

IL DEPOSITANTE



L'UFFICIALE ROGANTE

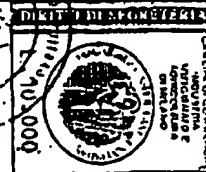
T.C.

Per copia conforme all'originale

«Si precisa che per tale domanda è allegato l'imposta di bollo e stata assolta conformemente alla circolare n° 163/83 dell'U.C.S. e succ. modif., con riserva di eventuali integrazioni che saranno dallo stesso richiedente in sede di concessione.»

il Direttore

Dott. M. Colosimo





MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO - Ufficio Italiano Brevetti e Marchi - ROMA

NOTA DI TRASCRIZIONE

La richiedente ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA', di nazionalità italiana, con sede in Roma, viale Regina Elena n.299,

a mezzo Mandatari: D.ssa Gemma Gervasi (N.238), Dr. Diego Pallini (N. 484), Dr. Giorgio Moretti (N.206), Dr. Angelo Passini (N. 73), Ing. Giorgio Coggi (N.148), Dr. Livio Brighenti (N.475), D.ssa Maria Vittoria Primiceri (N.465), D.ssa Raffaella Consuelo Asensio (N.504), Dr. Giulio Mariani (N.329), disgiuntamente, della NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.a., Corso di Porta Vittoria n.9, Milano,

CHIEDE

che codesto Spettabile Ufficio provveda a trascrivere, a favore di essa richiedente, l'intervenuta cessione,

da: BARBARA ENSOLI residente a Roma, via Festo Avieno 176 (CEDENTE),

a: ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA' con sede a Roma, Viale Regina Elena n.299 (CESSIONARIA),
relativamente al sottosegnato brevetto italiano:
- Domanda di brevetto per invenzione No.RM97A000743
depositata il 01.12.1997 ed avente titolo: "Tat di

HIV-1 o suoi derivati, da soli o in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate", nonché il relativo brevetto, ove già concesso;

Si allegano all'uopo:

- Copia autentica di atto di cessione, sottoscritto dalla CEDENTE personalmente dalla Sig.ra Barbara En-soli e sottoscritto per la CESSIONARIA dal Sig. Romano Rosario Di Giacomo, le cui firme sono state autenticate dal Dott. Giuliano Floridi, notaio in Roma in data 24.04.1998. Detto atto è stato registrato in data 12.05.1998, all'Ufficio del Registro di Roma.
- Attestazione di versamento di Lit. 120.000.= sul c/c postale 00668004 intestato all'Ufficio del Registro Tasse e Concessioni - ROMA.

- Lettera d'incarico.

Milano, li 03 Agosto 1998.

p. ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

Il Mandatario


DR. DIEGO PALLINI

08-08-98 15:21

Da- NOTAR BARTOLO & GERVASI

30039254379826

T-686 7.05/09 F-880

Prof. Dott. GIULIANO BORDI

Via Regina Elena n. 299
Tel. 4402690 - 44231893

Reg. n. 24

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

ATTO DI CESSIONE DI DOMANDA DI BREVETTO

TRA

Dott.ssa Barbara Ensoli, nata a Latina il
23.01.1960, cittadina italiana, residente in
Roma, via Festo Avieno 176, codice fiscale
n.NSLBBR60A63E472K nel seguito denominata per
brevità CEDENTE,

da una parte;

Istituto Superiore di Sanità, con sede in Roma,
viale Regina Elena n.299, C.F. num.80211730587 e
P.IVA num.03657731000, in persona del Dott. Romano
Rosario Di Giacomo, Dirigente Generale dei Servizi
Amministrativi dell'Istituto nato a Cassano IONIO
(CS) il 25.9.1937 nel seguito denominato per brevi
tà CESSIONARIO,

dall'altra parte;

tra dette parti, ut sopra rappresentate, si convie
ne e si stipula quanto segue:

Art.1

Il Cedente cede e trasferisce al Cessionario, il
quale accetta la proprietà piena ed esclusiva,
libera da ogni e qualsiasi vincolo reale di godi-
mento o garanzia, relativamente alla domanda di



REGISTRATO - ROMA

12-05-1998

AL N.

VOL.

CAVETTORE

Brevetto italiano appresso specificata (nel seguito denominata BREVETTO):

- DOMANDA DI BREVETTO per invenzione industriale n.RM97A000743 depositata l'1.12.1997 ed avente titolo: "Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli od in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate".

Art.2

Il CEDENTE cede, altresì, al CESSIONARIO ogni diritto in ordine al deposito di domande di brevetto all'estero, che siano basate sul diritto di priorità unionista di cui all'art.4 della Convenzione dell'Unione di Parigi, relativamente al BREVETTO di cui all'art.1.

Art.3

Il BREVETTO viene trasmesso al CESSIONARIO nello stato di fatto e di diritto nel quale esso si trovava.

Il CESSIONARIO rinuncia ad ogni garanzia in ordine alla validità del BREVETTO ed alla non interferenza dello stesso con diritti di esclusiva appartenenti a terzi.

Art.4

Il CEDENTE s'impegna a sottoscrivere tutta la



documentazione necessaria per operare la trascrizione del presente Atto presso l'Ufficio Italiano Brevetti e Marchi in Roma. Detta trascrizione verrà svolta a cura e spese del CESSIONARIO.

Sono a carico del CESSIONARIO le spese di copia bollo e quelle per la registrazione fiscale del presente atto unitamente a quelle per l'autentica notarile delle firme del CEDENTE e del legale rappresentante del CESSIONARIO.

Art.5

Il corrispettivo per il BREVETTO trasmesso con il presente atto dal titolo: "Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli od in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico e terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate" è pattuito in L.2.500.000.=(Duemilionicinquecentomila).

Tale somma verrà corrisposta dal CESSIONARIO mediante versamento sul c.c.b. n. 3886 cod. ABI

1005 - C.A.B. 03375, intestato alla D.ssa Barbara Ensoli presso la Banca Nazionale del Lavoro - sportello Istituto Superiore di Sanità - Roma.

Art.6

Il presente atto diverrà impegnativo per il CESSIONARIO solo dopo che siano intervenute le prescritte approvazioni e registrazioni di legge.

Letto, approvato e sottoscritto in duplice
originale, nel luogo e nella data qui in calce
riportati.

Roma - 24 - 06 - 98

Paolo Ensol
Di Giacomo Romano Rosario

REPERTORIO N.13436

AUTENTICA DI FIRMA

REPUBBLICA ITALIANA

Io sottoscritto dott. prof. Giuliano FLORIDI Notaio in Roma,
con studio al Viale Regina Margherita 239, iscritto nel Col-

~~legio Notarile dei Distretti Riuniti di Roma, Velletri e Ci-~~

vitavecchia, dichiaro e certifico vera ed autentica la firma

dei signori:

- Ensol Barbara, nata in Latina il 23 gennaio 1960 e resi-

dente in Roma, via Feste Avieno n.176, medico;

- Romano Rosario Di Giacomo, nato in Cassano Ionio (CS) il 25
settembre 1937 e domiciliato per la carica in Roma, viale Re-
gina Elena n.299, medico;

dell'identità personale dei quali io notaio sono certo, hanno
firmato la scrittura che precede in mia presenza e previa lo-
ro espressa e concordata rinuncia, col mio consenso, all'assi-

08-09-88

15:22

Da- NOTARBARTOLO & GERVASI

+0039254178030

T-666

P. 08/08

T-080



stenza dei testi.

Roma, al viale Regina Margherita 239, il ventiquattro aprile

millenovecentonovantotto.

F.to GIULIANO FLORENTINO - 1998

~~F.to GIULIANO FLORENTINO - 1998~~

che si riferisce per gli atti concernenti

Roma, 3 giugno 1998



H 02.03.98



MINISTERO DELL'INDUSTRIA COMMERCIO ED ARTIGIANATO

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi - ROMA

ISTANZA DI CORREZIONE E INTEGRAZIONE

Oggetto: Domanda di Brevetto per Invenzione Industriale n. RM97A000743 depositata il 01.12.1997 a nome Istituto Superiore di Sanità dal titolo: "Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli o in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico o terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate."

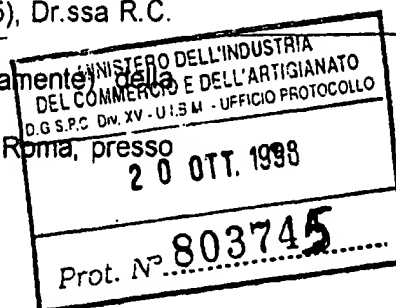
In base all'Art. 49 del DPR 22.06.79 n. 338 il sottoscritto Istituto Superiore di Sanità di nazionalità italiana con sede in Roma Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma, a mezzo mandatarî Dr.ssa Gemma Gervasi (n. 238), Dr. Diego Pallini (n. 484), Dr. Giorgio Moretti (n. 206), Dr. Angelo Passini (n. 73), Ing. Giorgio Coggi (n. 148), Dr. Livio Brighenti (n. 475), Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri (n. 465), Dr.ssa R.C.

Asensio (n. 504), Dr. G. Mariani (n. 329) (disgiuntamente) della

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A., Via Savoia, 82 - Roma, presso

cui elegge domicilio a tutti gli effetti di legge,

CHIEDE



che Codesto Spettabile Ufficio provveda ad apportare le seguenti correzioni ed integrazioni come dalle seguenti postille qui di seguito riportate:

Postilla 1: Pagina 1 della descrizione : Riga 16: dopo la parola "antivirale" **inserire:** "in presenza o meno di adiuvanti vaccinali".

Postilla 2: Pagina 1 della descrizione: Riga 17: dopo la parola

"mucosale" inserire la virgola e radiare "o".

Postilla 3: Pagina 1 della descrizione: Riga 19: dopo la parola "anti-CD28" **inserire:** ", e la veicolazione degli immunogeni con eritrociti o nanoparticelle".

Postilla 4: Pagina 12 della descrizione: Riga 11: dopo la parola "immunomodulante" **inserire:** "come l'IFN α o β ".

Postilla 5: Pagina 13 della descrizione: Dopo riga 16 andare a capo e **inserire:** "Studi recenti hanno dimostrato che la costimolazione di linfociti CD4+ con biglie paramagnetiche ricoperte con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 determina l'espansione logaritmica e policlonale dei linfociti provenienti da soggetti infetti con HIV [Levine et al., Science. 272: 1939-1943 (1996)] senza attivare la replicazione e la propagazione del virus. Questa attività antivirale è conseguente alla modulazione negativa dell'espressione di CCR5, il corecettore per i ceppi monolitotropi dell'HIV-1 [Carroll et al, Science. 276: 273-276, (1997)] e, in misura minore agli elevati livelli di chemochine indotti mediante costimolazione con anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 [Riley et al, J.Immunol. 158: 5545-5553, (1997)]. L'inventore ritiene che la possibilità di espandere linfociti autologhi da soggetti

infettati con HIV in assenza di replicazione/propagazione virale consente di approntare un efficace immunizzazione ex vivo, descritto negli esempi, che può essere di grande utilità nell'allestimento di un vaccino anti-Tat".

Postilla 6: Pagina 14 della descrizione: dopo riga 12 andare a capo e inserire." In particolare, l'inventore ritiene che l'uso di batteri (*Streptococcus gordonii* e *Lactobacillus*) "ingegnerizzati" ad esprimere gli antigeni virali sopra menzionati possa essere una valida strategia per indurre e/o potenziare una risposta immune specifica a livello delle mucose nella scimmia e nell'uomo. Questi batteri sono infatti in grado di colonizzare la mucosa orale e vaginale nei topi, e di indurre una risposta anticorpale specifica locale e sistemica nei confronti degli antigeni eterologhi espressi sulla superficie dei batteri ricombinanti [Oggioni et al., *Vaccine* 13: 775 (1995); Medaglini et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6868 (1995); Medaglini et al., *Vaccine* 15:1330 (1997); Pozzi et al., in "Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization", eds. Pozzi G. & Wells, J.M. – Landes, Austin, p. 35 (1997); Oggioni, et al., *Gene* 169:85 (1996); Rush, et al., in "Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization", eds. Pozzi G. & Wells, J.M. – Landes, Austin, p. 107 (1997); Medaglini et al., *Biothec. Annu. Rev.* 3:297 (1997); Medaglini et al., *Am. J. Reprod. Immunol.* 39:199 (1998)]. Infine, questi batteri funzionano come vettori vivi di vaccini, ed hanno il vantaggio di offrire una stimolazione prolungata del sistema immunitario.

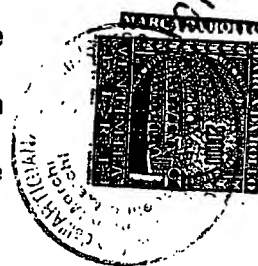
Inoltre, l'inventore ritiene che anche vettori virali ricombinanti del virus herpes simplex di tipo 1 (HSV-1), non replicativi, apatogeni [Marconi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci* 93:11319 (1996)], potranno essere utilizzati per esprimere proteine virali per l'induzione di una risposta sistemica (mediante immunizzazione cutanea, i.d.) e mucosale (per via orale,

vaginale o nasale). Infatti, si sfrutterebbe l'abilità di questi vettori di contenere estese sequenze esogene senza interferire nell'efficienza d'infezione [Glorioso et al., Ann. Rev. Microbiol. 49:675 (1995); Huard et al. Gene Ther. 2:385 (1995)]. Si potrebbero costruire vettori capaci di contenere più geni di HIV (regolatori, accessori e strutturali). I vettori erpetici possono inoltre essere interessanti per la possibilità di somministrazione per via orale, nasale o vaginale data la possibilità di HSV-1 di essere somministrato in modo diretto per via mucosale [Bowen et al., Res. Virol. 143:269 (1992); Kuklin et al., J. Virol. 240:245 (1998)].

L'inventore ritiene che Tat (proteina e/o DNA) da sola o in combinazione con gli altri immunogeni sopra descritti possa essere inoculata utilizzando nuovi sistemi di delivery, quali eritrociti o nanoparticelle. In particolare, ritiene che sia possibile veicolare antigeni legati sulla membrana di eritrociti autologhi [Magnani et al., Biotech. Appl. Biochem. 16:188 (1992) and 20:335 (1994)]. Poiché gli eritrociti, alla fine della loro vita (nell'uomo 120 giorni), sono rimossi dal circolo dalle cellule del sistema macrofagico, notoriamente professioniste della presentazione dell'antigene, questa proprietà

potrebbe essere opportunamente sfruttata a scopi vaccinali. Infine, un'ulteriore strategia di delivery può essere rappresentata dalle nanoparticelle. Nanoparticelle funzionali rappresentano sistemi estremamente interessanti per il trasporto ed il rilascio controllato di proteine e DNA [Chavany et al., Phar. Res. 9: 441 (1994); Zobel et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7: 483 (1997)] in quanto possono

H 02.03.99



essere realizzate con elevato grado di affinità nei confronti di queste molecole biologicamente attive. Le nanosfere sono particelle polimeriche colloidali, di differente composizione chimica, variabili in grandezza da 10 a 1000 nm. Alla superficie, o al loro interno, è possibile adsorbire sostanze di diversa natura (oligonucleotidi, farmaci, proteine, peptidi, DNA) che vengono in tal modo veicolate nel citoplasma o nel nucleo della cellula dove sono rilasciate gradualmente. Queste proprietà, inoltre, permettono di utilizzare quantità estremamente basse di sostanza. Le nanoparticelle costituiscono quindi un ottimo sistema di delivery soprattutto per quelle sostanze che, per loro natura, sarebbero instabili nell'ambiente intracellulare o di cui si voglia aumentarne l'efficacia o la veicolazione verso cellule specifiche." e **radiare da riga 13 di pagina 14 a riga 2 di pagina 15 della descrizione.**

Postilla 7: Pagina 15 della descrizione: Riga 5: dopo la parola "parti" **inserire:** "in presenza o meno di adiuvanti vaccinali".

Postilla 8: Pagina 15 della descrizione: Riga 23: **sostituire:** "Rivendicazioni" con "Sommario dell'Invenzione".

Postilla 9: Pagina 17 della descrizione. Riga 19. dopo "CD28" **aggiungere** "eventualmente coniugati a biglie paramagnetiche".

Postilla 10: Pagina 17 della descrizione: dopo Riga 21: **andare a capo** e **inserire:** "11. un vaccino, come descritto nei punti precedenti, in combinazione con gli adiuvanti che ne potenzino la risposta immune.

12: un vaccino, come descritto nei punti precedenti, somministrato in associazione a sistemi di veicolazione e di rilascio (delivery systems), da soli o in combinazione, quali nanoparticelle, vettori erpetici, globuli rossi, batteri e, comunque, ogni sistema di delivery con i quali il vaccino sopra descritto, in tutte le sue combinazioni, potrà essere somministrato."

Postilla 11: Pagina 19 della descrizione: dopo Riga 10: **inserire:** "A tale proposito, per inibitori della replicazione virale intendiamo tutte le molecole, conosciute attualmente o quelle che verranno in seguito scoperte (inibitori nucleosidici e non nucleosidici della trascrittasi inversa, inibitori delle proteasi, RNA antisenso e, in genere, tutte le molecole in grado di bloccare l'espressione dei geni di HIV) in grado di limitare o bloccare la replicazione di HIV.

Come accennato precedentemente, si descrivono differenti metodi di immunizzazione che prevedono l'utilizzo di Tat in associazione con altri geni o proteine virali, o parti di essi, o geni o proteine di citochine immunomodulatrici, o parti di essi. Per "parti di essi" (o "parti di esse") si intendono segmenti dei geni o delle proteine sopraccitati, dei quali (o delle quali) si dimostri l'efficacia nell'indurre gli stessi effetti

immunogenici del gene o della proteina interi.

Inoltre, poiché è nota l'efficacia degli adiuvanti nelle strategie vaccinali, la presente invenzione si riferisce all'utilizzo degli adiuvanti conosciuti e di quelli che verranno scoperti in futuro, somministrati insieme a Tat (proteina o DNA) e alle combinazioni di Tat e altri geni o proteine virali o cellulari. Analogamente, viene ipotizzata l'efficacia dei differenti

sistemi di veicolazione e di rilascio (delivery systems) di Tat (proteina o DNA) e delle combinazioni di Tat e altri geni o proteine virali o cellulari, sia nell'induzione di un'immunità generale che di un'immunità locale verso Tat (immunizzazione mucosale).

Risultati ottenuti dall'autore e non ancora pubblicati, indicano che solo la proteina Tat nella sua forma biologicamente attiva è in grado di legare specifici recettori cellulari e di entrare nella cellula. Tale proprietà è alla base della risposta immune da parte delle cellule accessorie e delle cellule immunitarie in genere e, secondo l'autore, è fondamentale nell'indurre una risposta immune molto più forte di quella che la proteina inattiva sia in grado di stimolare. In conclusione, a differenza dell'utilizzo di Tat inattivato come immunogeno, proposto da alcuni ricercatori, si intende utilizzare Tat di HIV-1, o suoi mutanti, nella sua forma biologicamente attiva per indurre una forte risposta immune verso l'HIV in grado di prevenire l'infezione o la malattia e per attuare strategie terapeutiche efficaci negli individui infettati da HIV-1. Il vaccino secondo l'invenzione può essere veicolato per via sistemica (intramuscolare, intradermica, sottocute, etc) o locale (mucosale). Questa via è preferita quando si utilizzano come delivery systems i

batteri di cui si dirà appresso. Il principio attivo del vaccino può essere preparato come liofilo ed essere immagazzinato. Quindi, per l'uso, può essere risospeso in siero autologo.

Fanno parte della presente invenzione le cellule trasformate comprendenti un vettore esprimente Tat o suoi mutanti o sue parti

H 00.03.99

come detto nella descrizione, cellule che vengono coltivate per esprimere la proteina Tat, che a sua volta viene isolata per l'uso.

Si intende che nell'ambito della presente invenzione sono ricomprese tutte quelle varianti di Tat di qualsiasi tipo o sottotipo di HIV che abbiano attività almeno analoga a quella descritta."

Postilla 12: Pagina 20 della descrizione: Riga 7: **sostituire:** "10 o con 100 µg" con: "100 (M1) e 10 (M2) µg".

Postilla 13: Pagina 20 della descrizione: Riga 9: dopo la parola "inoculata" **inserire:** "(M3)" e andare a capo.

Postilla 14: Pagina 20 della descrizione: Riga 10: dopo "22" **radiare** "e 27 settimane" e **aggiungere:** ", 27, 32, 37 settimane. La ricerca degli anticorpi era effettuata anche alla settimana 41 per la scimmia M2, inoculata con 10 µg di proteina Tat, e la scimmia M3."

Postilla 15: Pagina 20 della descrizione: Riga 11: **sostituire** la parola "plasmi" con "sieri".

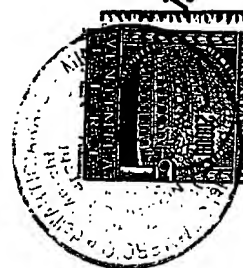
Postilla 16: Pagina 20 della descrizione: Riga 15: **radiare:** " PBS A 1x" e **sostituire con:** "PBS senza Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ (PBS-A)".

Postilla 17: Pagina 21 della descrizione: Riga 3: dopo "1:50" **inserire:** "e 1:100".

Postilla 18: Pagina 21 della descrizione: Riga 4: **sostituire:** "(± S.D.)" con: "+ 3 Deviazione Standard (S.D.)".

Postilla 19: Pagina 21 della descrizione: Riga 6: dopo la parola "campione" **aggiungere:** "diluito 1:50".

H 02.03.99



Postilla 20: Pagina 21 della descrizione: Riga 7: dopo la parola "pozzetti" **radiare:** ",sottratti del valore del cut off \pm S.D. (Δ OD405);" e inserire il punto.

Postilla 21: Pagina 21 della descrizione: Riga 8: dopo ">2,7" aggiungere: "indica che".

Postilla 22: Pagina 21 della descrizione: Riga 10: dopo la parola "Titolazione" **radiare:** "dei plasmi delle scimmie inoculate con 100 e 10 μ g di proteina Tat ricombinante, descritti nella figura 2." E **inserire:** "degli anticorpi anti-Tat nei sieri delle scimmie inoculate con 100 (M1) e 10 (M2) mg di proteina Tat ricombinante, descritti nella figura 2. Il saggio ELISA era eseguito come descritto nella figura 2. In questo caso i sieri delle scimmie erano saggiati (in doppio) diluiti scalarmente da 1:50 a 1:25.600."

Postilla 23: Pagina 21 della descrizione: Riga 13: dopo le parole "cut off" **inserire:** "relativo a ciascuna diluizione. Il valore di cut off calcolato per ciascuna diluizione corrispondeva alla media +3 S.D.delle letture dei sieri prelevati al tempo 0 di tutte le scimmie ottenute in tutti gli esperimenti."

Postilla 24: Pagina 21 della descrizione: dopo Riga 13, andare a capo e : **inserire:** " **FIGURA 4.** Mappatura degli epitopi riconosciuti dagli anticorpi IgG anti-Tat delle scimmie inoculate con 100 (M1) e 10 (M2) μ g di proteina Tat ricombinante, descritte nella figura 2. Per mappare gli epitopi riconosciuti dagli anticorpi anti-Tat, sono stati eseguiti saggi ELISA utilizzando 8 peptidi sintetici, corrispondenti agli aminoacidi (aa)

di Tat 1-20, 21-40, 36-50, 46-60, 52-72, 56-70, 65-80 e 73-86. 100 μ l di ciascun peptide (alla concentrazione di 10 μ g/ml in PBS-A/0.1% BSA) erano adsorbiti a ciascun pozzetto in piastre da 96 di PVC per 12 ore a 4° C. Le piastre erano successivamente lavate ed incubate con 100 μ l di PBS-A/3% BSA per 2 ore a 37° C, lavate 3 volte con PBS-A/Tween 0.05%, ed incubate con 50 μ l per pozzetto dei sieri diluiti in PBS-A/3% BSA. Il saggio era quindi eseguito come descritto nella figura 2. I sieri erano prelevati alla 37^a settimana dall'inizio della vaccinazione. I valori di cut off, calcolati per ciascun peptide e per ogni diluizione, corrispondono alla media +3 S.D. della lettura dei sieri prelevati al tempo 0 di tutte le scimmie ottenute in tutti gli esperimenti. (A) Riporta i risultati, relativi ai sieri diluiti 1:50 e a ciascun peptide, che corrispondono alla media delle densità ottiche a 405 nm delle letture di due pozzetti; (B) riporta i risultati relativi alla titolazione dei sieri mostrati in (A) e sono rappresentati in ordinata come il reciproco della diluizione più alta di siero che a 405 nm dava una lettura superiore al valore di cut off relativo a ciascuna diluizione. ".

Postilla 25: Pagina 21 della descrizione: Riga 14: sostituire "4" con "5".

Postilla 26: Pagina 21 della descrizione: Riga 22: Dopo la parola "settimane." Inserire: "La ricerca degli anticorpi era valutata alle settimane 2, 6, 11 e 15. L'esecuzione dei saggi ELISA è descritto nella figura 2. " e radiare da "L'esecuzione" a "figura 2.".

Postilla 27: Pagina 22 della descrizione: Riga 3: dopo il valore "1:1000." **Aggiungere:** "Il valore di cut off era calcolato come la media (+ 2 S.D.) delle letture dei sieri di tutte le scimmie, prelevati al tempo 0. I risultati riportati nell'istogramma relativi a ciascun campione corrispondono alla media delle densità ottiche a 405 nm delle letture dei due pozzetti, sottratti del valore di cut off (ΔOD_{405}).".

Postilla 28: Pagina 22 della descrizione: Riga 4: **sostituire:** "5" con "6" e dopo la parola "umorale" **radiare** "del" e **inserire:** "anti-Tat specifica di" e **radiare:** "specifica anti-Tat".

Postilla 29: Pagina 22 della descrizione: Riga 5: dopo "con" **radiare:** "Tat" e **aggiungere** "proteina Tat ricombinante".

Postilla 30: Pagina 22 della descrizione: Riga 11: dopo "6,11" **radiare:** "e 15" e "riga 12 e 13" e **inserire:** "15, 21, 28 e 32 settimane. Alla 36^a settimana le scimmie M1-M6 erano inoculate con 15 µg di proteina Tat risospesa in 200 ml di Iscom e 300 ml di PBS. La ricerca degli anticorpi era valutata anche alla settimana 40 e 44. L'esecuzione dei saggi ELISA e la determinazione dei valori di cut off sono descritti nella figura 2. I risultati riportati in figura sono relativi ai campioni diluiti 1:50. >2,7 indica che i valori di lettura erano fuori scala.".

Postilla 31: Pagina 22 della descrizione: Riga 14: **sostituire** "6" con "7" e dopo la parola "Titolazione" **radiare:** "dei sieri delle scimmie inoculate con la" e **inserire:** "degli anticorpi anti-Tat nei sieri delle scimmie inoculate con la proteina".

Postilla 32: Pagina 22 della descrizione: Riga 16: dopo "(M4-6)" aggiungere: "descritti nella figura 6".

Postilla 33: Pagina 22 della descrizione: Riga 18: dopo le parole "cut off" aggiungere: "calcolato per ciascuna diluizione, come descritto nella figura 3".

Postilla 34: Pagina 22 della descrizione: dopo Riga 18 andare a capo e inserire: **"FIGURA 8.** Mappatura degli epitopi riconosciuti dagli anticorpi IgG anti-Tat delle scimmie inoculate con la proteina Tat ricombinante (10 µg) in presenza dell'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum (M4-6), descritti nella figura 6. I sieri erano prelevati alla 21^a settimana dall'inizio della vaccinazione. L'esecuzione dei saggi ELISA e la determinazione dei valori di cut off sono descritti nella figura 4. I risultati riportati nell'istogramma (A) sono relativi ai campioni diluiti 1:50 e a ciascun peptide e corrispondono alla media delle densità ottiche a 405 nm delle letture di due pozzetti. I risultati raffigurati nell'istogramma (B) sono relativi alla titolazione dei sieri mostrati in (A) e sono rappresentati in ordinata come il reciproco della diluizione più alta di siero che a 405 nm dava una lettura superiore al valore di cut off.

FIGURA 9. Analisi della presenza di una risposta CTL specifica anti-Tat. Il saggio era eseguito come descritto nella Tabella 5. Nella figura è riportato un esempio relativo alla 36^a settimana della scimmia M1, inoculata per via sottocutanea con 10 µg della proteina Tat e RIBI, descritta nella figura 6. I quadrati (controllo) corrispondono alle cellule incubate con la linea bersaglio B1cl non pulsata con il Tat; i rombi

H 02 03 04

corrispondono alle cellule incubate con la linea bersaglio Bcl pulsata con il Tat (1 mg / 250.000 cellule).".

Postilla 35: Pagina 22 della descrizione: Riga 19: sostituire "7" con "10".

Postilla 36: Pagina 22 della descrizione: Riga 21: dopo "BSA" radiare "e" e inserire "oppure".

Postilla 37: Pagina 23 della descrizione: Riga 2: dopo "M2" aggiungere ", inoculata con 10 µg della proteina Tat e RIBI è descritta nella figura 6,".

Postilla 38: Pagina 23 della descrizione: Dopo Riga 4 andare a capo e inserire: "**FIGURA 11.** Risposta umorale di tipo IgG specifica anti-Tat in una scimmia (M1) inoculata con 200 µg di DNA, del plasmide PCVTat risospeso in 150 µl di PBS-A, per via intradermica in 2 siti vicini ai linfonodi ascellari; una scimmia (M2) inoculata con 500 mg di PCVTat, risospeso in 250 µl di PBS-A, per via intramuscolare in 2 siti nel dorso; la scimmia di controllo (M3) non era inoculata, ma riceveva come controllo di specificità ripetuti skin tests con Tat. Le scimmie erano inoculate con PCVTat al tempo 0 e dopo 5, 10, 15, 22, 27, 32 e

37 settimane. Infine, dopo 42 settimane le scimmie ricevevano un richiamo con la proteina Tat ricombinante (15 µg) risospesa in 200 µl di Iscom e 300 µl di PBS. La ricerca degli anticorpi era valutata alle settimane 2, 5, 10, 15, 22, 27, 32, 37, 42, 48 e 58. La presenza della risposta anticorpale anti-Tat nei sieri degli animali era analizzata mediante saggi ELISA, come descritto nella figura 2. I risultati riportati



nell'istogramma, relativi a ciascun campione diluito 1:50, corrispondono alla media delle densità ottiche a 405 nm delle letture dei due pozzetti.

(A) Riporta i risultati ottenuti dalle due scimmie vaccinate con 200 (M1) e 500 (M2) μ g di DNA del plasmide pCVTat. (B) Riporta i risultati relativi alla scimmia di controllo (M3) non inoculata.

FIGURA 12. Titolazione degli anticorpi anti-Tat nel siero della scimmia M2 inoculata per via intradermica con 200 mg di DNA del plasmide pCVTat. L'esecuzione del saggio ELISA è descritta nella figura 2. I risultati in ordinata sono rappresentati come il reciproco della diluizione più alta del plasma che a 405 nm dava una lettura superiore al valore di cut off relativo a ciascuna diluizione.

FIGURA 13. Analisi della risposta umorale di tipo IgG specifica anti-Tat in tre scimmie (M9-11) inoculate per via intramuscolare con 1 mg di DNA del plasmide pCVTat e in una scimmia di controllo (M12) inoculata con 1 mg di DNA del plasmide pCV0. Il DNA era risospeso in 1 ml di PBS-A ed inoculato per via intramuscolare in 2 siti nel dorso. Le scimmie erano inoculate al tempo 0 e dopo 6, 11, 15, 21, 28 e 32 settimane. Alla 36^a settimana le scimmie M9-M11 ricevevano una ~~inoculazione di richiamo con 15 μ g di proteina Tat ricombinante~~ risospesa in 200 μ l di Iscom e 300 μ l di PBS. La presenza di anticorpi anti-Tat era ricercata alle settimane 2, 6, 11, 15, 21, 28, 32, 36, 40, e 44. L'esecuzione dei saggi ELISA e la determinazione dei valori di cut off sono descritti nella figura 2."

Postilla 39: Pagina 23 della descrizione: Riga 5: **sosituire "8" con "14".**

Postilla 40: Pagina 23 della descrizione: Riga 9: **radiare:** "metodiche immunomagnetiche" e **sostituire con** "biglie paramagnetiche".

Postilla 41: Pagina 23 della descrizione: Riga 10: **radiare** la parola "parte" e **sostituire con** "metà".

Postilla 42: Pagina 23 della descrizione: Riga 11: **radiare** la parola "parte" e **sostituire con** "metà".

Postilla 43: Pagina 23 della descrizione: Riga 17: **sostituire "9" con "15".**

Postilla 44: Pagina 23 della descrizione: Riga 19: dopo la parola "ottenuti" **radiare da** "con le metodiche ... " **fino a** "nell'esempio 5." e **inserire** "da 4 scimmie con la procedura descritta nella figura 14, venivano stimolati come riportato nell'Esempio 7.".

Postilla 45: Pagina 24 della descrizione: Riga 1: **sostituire "5" con "7"** e **inserire:** "**FIGURA 16** Caratterizzazione funzionale di cellule dendritiche (DC) ottenute dal sangue periferico di scimmie. A. Incorporazione di timidina tritiata al giorno 4 di coltura mista leucocitaria allogeneica (AMLR): comparazione della funzione di presentare l'antigene (APC, misurata come induzione della

proliferazione di cellule T allogeneiche) tra DC e macrofagi (MØ) ottenuti da PBMC di sangue periferico di *Macaca fascicularis* dopo separazione su gradiente di Percoll e aderenza su plastica. Le cellule non aderenti erano rimosse e quelle aderenti erano indotte a maturare in DC con l'aggiunta di GM-CSF (200 ng/ml) e IL-4 (200 U/ml) ogni 3 giorni. La metà del terreno di coltura (RPMI 10% FCS) veniva poi

rimossa e sostituita con terreno fresco ogni 3 giorni. Dopo 6-7 giorni di coltura si osservava un cambiamento morfologico nelle cellule indotte con citochine che acquisivano l'aspetto tipico delle DC (perdita dell'aderenza, clusterizzazione, propaggini), anche verificato con l'ausilio di marcatori di membrana tipici (dati non mostrati). Le cellule monocitarie non venivano indotte con citochine ed erano coltivate nel medesimo terreno con cambi del sovrinatante effettuati ogni 3 giorni. Tali cellule mantenevano le caratteristiche monocito-macrofagiche, quali l'aderenza. Al 7° giorno entrambe le popolazioni cellulari erano cimentate con linfociti T provenienti da un donatore umano, purificati tramite gradiente di Ficoll e Percoll ed aderenza, ed in seguito congelati.

Il test di proliferazione cellulare di linfociti T umani eseguito con DC o Mø di scimmia era eseguito in piastra da 48 pozzetti. 0.5×10^6 linfociti T erano stimolati con 5000 DC o Mø (Rapporto T:APCs = 100:1). La coltura era mantenuta per 4 giorni, e aliquote fisse della sospensione cellulare erano poi trasferite in piastre da 96 pozzetti in triplicato a cui veniva aggiunto $1 \mu\text{Ci}$ per pozzetto di timidina tritiata per 16 ore. Al termine dell'incubazione, le conte per minuto (cpm) emesse dal

marcatore radioattivo incorporato dalle cellule erano ottenute tramite lettura con un contatore a scintillazione.

B. Le cellule presentanti l'Ag (APCs) quali DC e Mø, ottenute con le medesime modalità riportate in figura 16A, erano cimentate con linfociti T di un'altra scimmia, ottenuti come riportato nell'esperimento precedente per il donatore umano, per verificare la maggiore capacità

H 00.03.99

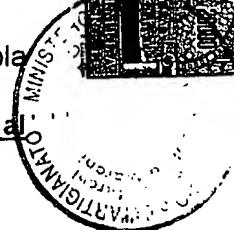
di presentare l'Ag che è la caratteristica tipica delle DC rispetto ai Mø.
In questo caso le APCs erano aggiunte a concentrazioni scalari ai linfociti T in modo da valutare le risposte proliferative ottenute a vari rapporti linfociti T:APCs (DC o Mø).".

Postilla 46: Pagina 40 della descrizione: Ultima Riga: dopo la parola "specificità" inserire "ed efficacia protettiva della immunizzazione al challenge virale".

Postilla 47: Pagina 41 della descrizione: Riga 2: dopo la parola "cellulare)" inserire: "e protettiva al challenge virale".

Postilla 48: Pagina 41 della descrizione: Riga 14: dopo la parola "abbiamo" **radiare** da "inoculato..." a "non inoculata." e **inserire:** "valutato la tollerabilità, la sicurezza e la capacità di indurre una risposta immune specifica (umorale e cellulare). Pertanto 3 scimmie sono state inoculate secondo il seguente schema: la scimmia 1 (M1) è stata inoculata con la proteina Tat ricombinante (100 mg), risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI, per via sottocutanea in un sito; la scimmia 2 (M2) è stata inoculata con la proteina Tat ricombinante (10 mg), risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI, per via sottocutanea in un sito; e la scimmia 3 (M3) è la scimmia di controllo non inoculata.".

Postilla 49: Pagina 41 della descrizione: Ultima riga: dopo il valore "22," **radiare** "e 27 settimane." e **inserire** "27, 32 e 37 settimane. Il protocollo di immunizzazione è stato interrotto alla settimana 37 per la scimmia M1 e alla settimana 41 per la scimmia M2. Gli animali sono



stati sacrificati per lo studio di parametri immunologici in diversi organi e tessuti (milza e linfonodi), quali la determinazione dell'attività proliferativa al Tat, dell'attività CAF e della presenza di CTL. Per attività CAF si intende l'attività antivirale mediata dalle cellule CD8+, non MHC-ristretta, né citolitica."

Postilla 50: Pagina 42 della descrizione: Riga 6: **radiare:** "IL-15".

Postilla 51: Pagina 42 della descrizione: Riga 8: **radiare:** "e CD45RO".

Postilla 52: Pagina 42 della descrizione: Riga 9: dopo la parola "attività" **radiare:** da "CTL e NK..." a "(CAF). e **inserire:** "citotossica specifica (CTL), la presenza di attività antivirale CAF e la presenza di attività antivirale totale (TAA) mediata dai PBMC e dal siero autologo."

Postilla 53: Pagina 42 della descrizione: Riga 13: **radiare** da: "Questo esperimento" a "non inoculata" di pagina 45 della descrizione e **inserire** "I risultati di questo esperimento sono i seguenti. Nelle scimmie vaccinate e nel controllo non si erano osservate alterazioni significative dei parametri chimico-fisici, ematologici e comportamentali. Non erano osservati segni di infiammazione e neoformazioni vascolari nei siti di inoculazione. Questi risultati indicano che la proteina Tat era

ben tollerata dagli animali e non era tossica nelle dosi somministrate, utilizzando la via di inoculazione scelta. Nelle scimmie M1 e M2 erano presenti anticorpi IgG specifici anti-Tat a partire dalla 5^a settimana dopo la prima inoculazione. Alla 37^a settimana IgG anti-Tat erano evidenziabili alla diluizione di 1:6400 nel plasma di entrambe le scimmie e, alla 41^a settimana, alla diluizione di 1:12.800 nel plasma

della scimmia M2. I risultati sono riportati nelle figure 2 e 3. Nella scimmia di controllo M3 erano evidenziabili anticorpi anti-Tat a basso titolo probabilmente elicitati dalle ripetute inoculazioni di piccole quantità di Tat per l'esecuzione dello skin test effettuata in questa scimmia come controllo di specificità. Nelle scimmie M1 ed M2, gli anticorpi anti-Tat erano diretti principalmente contro la regione amino terminale (aa 1-20) di Tat, con un titolo di 1:3200 (figura 4). Nella scimmia M2, inocolata con 10 µg di Tat, erano evidenziati anche anticorpi diretti contro i peptidi corrispondenti agli aa 36-50 e 46-60 di Tat, con titoli di 1:50 e 1:100 rispettivamente (figura 4). L'attività neutralizzante il Tat del siero delle scimmie vaccinate veniva saggiata mediante saggi di inibizione del "rescue" dell'infezione virale in cellule HLM-1 trattate con la proteina Tat esogena, come precedentemente descritto [Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)]. Tali saggi hanno dimostrato che i sieri delle scimmie M1 e M2, diluiti 1:2 e ottenuti alla 27^a settimana dal primo inoculo, erano in grado di bloccare la replicazione virale indotta da Tat esogeno, misurata tramite determinazione dell'antigene p24 nel sopranatante delle cellule, mentre il siero delle stesse scimmie al tempo 0 (preimmune) non aveva attività

bloccante verso il Tat (Tabella 4).

TABELLA 4

*Attività neutralizzante dei sieri sul "rescue" dell'infezione virale indotta da Tat extracellulare**

Campioni	Inibizione (%)
Tat (30 ng/ml) + Siero preimmune M1	0
Tat (30 ng/ml) + Siero preimmune M2	0
Tat (30 ng/ml) + Siero immune M1	79,12
Tat (30 ng/ml) + Siero immune M2	100

"L'attività neutralizzante dei sieri è stata determinata in cellule HLM-1 (cellule HeLa contenenti integrata una copia del provirus HIV-1 difettivo del gene tat). Cellule HLM-1 sono state piastrate alla concentrazione di 6×10^5 cellule per pozzetto in piastre da 24 pozzetti ed incubate a 37°C per 16 ore. Le cellule sono state lavate 2 volte con PBS contenente albumina sierica bovina (BSA) allo 0.1%, ed incubate per 48 ore con terreno di crescita (0.3 ml) a cui veniva aggiunta la proteina Tat ricombinante in presenza di un ugual volume di sieri delle scimmie prelevati al tempo 0 (preimmuni) o alla 27^a settimana (immuni). I controlli negativi erano rappresentati dalle cellule trattate solo con un pool dei sieri preimmuni, immuni, o con PBS contenente BSA allo 0.1% (PBS + 0.1% BSA) ma in assenza di Tat. Per tutti questi controlli non si sono osservati effetti sul rescue virale. Ogni campione è stato saggiato in doppio. Sui supernatanti cellulari era quindi ricercata la presenza di virus rilasciato dalle cellule mediante determinazione dei valori di antigene p24 Gag, utilizzando un kit commerciale p24 antigene capture - Elisa (Nen Dupont). I risultati sono espressi come percentuale di inibizione del rescue virale [misurato come la media della p24 (pg/ml) in 2 pozzetti per campione] ottenuto con i sieri immuni rispetto ai sieri

preimmuni (0 % di inibizione). Le scimmie M1 e M2 erano inoculate con la proteina Tat ricombinante (100 mg o 10 mg, rispettivamente) risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI, ed inoculata per via sottocutanea in un sito del dorso in prossimità dei linfonodi ascellari. I risultati dimostrano la comparsa di una risposta proliferativa al Tat alla 22^a settimana (Tabella 5) nelle scimmie inoculate con la proteina Tat,

H 02.03.99

essendo maggiore nella scimmia M2 che riceveva ad ogni inoculazione
10 mg di proteina Tat ricombinante.

TABELLA 5

Risposta proliferativa al Tat^a

N° scimmia	Stimolo	Settimane dall'inizio della immunizzazione				
		15	22	27	32	37
M1	PHA	15,3	13,9	19,9	40,6	3,2
	TT	1,2	4,7	2,1	3,8	2
	Tat	0,8	2,4	1,1	1,3	0,6
M2	PHA	8,1	11,6	17,1	16,8	1,7
	TT	2	3,8	1,7	1	0,6
	Tat	0,9	3	1,4	1,2	0,6
M3	PHA	5,1	19,9	18,2	6,6	8,1
	TT	7,2	6,2	5,5	2,8	5,6
	Tat	2,1	1,4	1,3	0,7	0,9

^aLinfociti di sangue periferico isolati mediante gradiente di Ficoll e seminati a 2×10^5 cellule per pozzetto in triplicato in piastre da 96 pozzetti, erano cresciuti in RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino e stimolati con Tat (1 o 5 mg/ml), PHA (4 mg/ml), o il tossoide del tetano (TT) (10 mg/ml), contro cui tutti le scimmie erano vaccinate. Campioni di controllo non stimolati erano incubati solo con il terreno di crescita. L'incremento della proliferazione cellulare era determinata al 5° giorno con saggio di incorporazione di timidina triziata come descritto [Ensoli et al., IV International Conference on AIDS, Stockholm, 1:241 (1988); Cafaro et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 7:204 (1991)]. I risultati sono riportati come indice di stimolazione calcolato secondo la seguente formula: media dei cpm del campione/media dei cpm dei controlli. Sono considerati positivi i valori superiori a 2. Le scimmie M1 e M2 erano inoculate con la proteina Tat ricombinante (100 mg o 10 mg, rispettivamente) risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI,

ed inoculata per via sottocutanea in un sito. La scimmia M3 è una scimmia di controllo non inoculata.

I risultati riportati in Tabella 6 indicano l'assenza di linfociti T citotossici (CTL) nelle scimmie M1 e M2 vaccinate con la proteina Tat ricombinante.

TABELLA 6

Analisi dell' attività citotossica specifica per Tat (CTL)^a

N° Scimmia	Settimana	Rapporto bersaglio/effettore						Attività CTL
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,12 5	Media	
M1	41	0	0	0	0	0	0	-
M2	41*	0	0	0	0	0	0	-
M3	41	0	0	0	0	0	0	-

^a Gli effettori erano preparati come segue. I PBMC erano purificati in gradiente di Ficoll, risospesi alla concentrazione di 1×10^7 cellule/ml in RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino ed incubati in piastre da 24 pozzetti (500 μ l per pozzetto) per 12 ore a 37° C in assenza o in presenza della proteina Tat (1 μ g/pozzetto). Il giorno successivo le cellule coltivate in assenza di Tat erano centrifugate a 1500 rpm, risospese in 50 μ l di RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino, incubate per 3 ore a 37° C in presenza di Tat (1 μ g), lavate ed infine risospese in 500 μ l di terreno ed aggiunte alle cellule coltivate dal giorno precedente in presenza di Tat. Dopo ulteriori 24 ore, le cellule erano diluite con 1 ml di terreno completo contenente IL-2, alla concentrazione finale di 2 U/ml, e cresciute a 37° C per 14 giorni. Le cellule bersaglio (B1cl) erano rappresentate da linee primarie di

linfociti B autologhe, preparate per ciascuna scimmia prima di iniziare la vaccinazione. A questo scopo i PBMC, prelavati al giorno -35 e purificati mediante gradiente di Ficoll, erano coltivati alla concentrazione di 3×10^5 cellule per pozzetto in piastre da 96 in presenza del 50% di terreno derivato da una linea che produce Papiovirus, descritta precedentemente [Chen et al., J. Immunol. 149:4060 (1992)], per due o tre settimane. Una decina di linee B erano ottenute per ciascun animale, espanse e congelate. Per il saggio di tossicità era utilizzato il kit Delfia Cytotoxicity Test (Wallac, Turku, Finland) che sfrutta il principio della "time-resolved fluorescence" [Blomberg et al., J. Immunol. Methods 160:27-34 (1993); Blomberg et al., J. Immunol. Methods 168:267-273 (1994); Blomberg et al., J. Immunol. Methods 193: 199-206 (1996)]. A tale scopo, le Bcl1 erano coltivate alla concentrazione di 1×10^6 cellule/200 μ l di terreno contenente il 10% di siero fetale bovino in assenza o in presenza della proteina Tat (4 μ g), per 12 a 37° C. Le Bcl1, erano quindi lavate, risospese in 1 ml di terreno contenente il 10% di siero fetale bovino ed incubate per 15 min a 37° C in presenza di 5 μ l di fluorescence enhancing ligand, fornito dal kit.

Dopo cinque lavaggi, le cellule Bcl1 erano risospese alla concentrazione di 5×10^4 /ml, immediatamente centrifugate a 1800 rpm per prelevare il surnatante che successivamente serviva per determinare il valore di background. I PBMC (effettori) erano seminati (in doppio) alla concentrazione di 2.5×10^4 cellule/100 μ l in terreno contenente IL-2 ed opportunamente diluiti in piastre da 96 pozzetti a cui venivano aggiunti 5×10^3 cellule bersaglio/100 μ l (coltivate in presenza o in assenza di Tat).

H 02.03.99

I rapporti cellule bersaglio/effettori erano 1:50, 1:25, 1: 12.5, 1:6.25, 1:

3.125. I PBMC a cui erano state aggiunte le cellule bersaglio (pulsate o

non pulsate con il Tat) erano incubati per 2 ore a 37° C con: 1) 20 µl di

Triton al 5% , per determinare il massimo rilascio; 2) con 100 µl di

terreno, per determinare rilascio spontaneo; 3) 200 µl del terreno della

cellule bersaglio, per determinare il valore di background. Al termine

dell'incubazione, le piastre erano centrifugate, 20 µl di ciascun

supernatante erano trasferiti in una nuova piastra ed incubati per 20'

con 200 µl di una soluzione contenente europio e fornita dal kit. I

campioni erano letti al citofluorimetro (Victor, Wallac, Turku, Finland).

L'attività CTL specifica era valutata con la seguente formula: Rilascio

specifico % = [(Media delle letture - Background) - (Rilascio spontaneo -

Background)] / [(Rilascio massimale - Background) - (Rilascio

spontaneo - Background)] x 100. Il saggio era considerato positivo

quando la media delle differenze alla varie concentrazioni di effettori era

superiore al 4%. Il 4% è un valore arbitrario stabilito sulla base di saggi

di controllo effettuati in precedenza. ND, non determinato. Le scimmia

M2 era inoculata con la proteina Tat ricombinante (10 mg) risospesa in

250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI, ed inoculata per via

sottocutanea in un sito. La scimmia M3 è una scimmia di controllo non

inoculata.

** I linfociti erano isolati dai linfonodi periferici quando la scimmia M2 è stata sacrificata.*

I risultati inoltre dimostrano la presenza di attività antivirale solubile

mediata dai linfociti T CD8+ (CAF) alla 22^a, 27^a e 37^a settimana,

H 02.03.99

valutata come la capacità dei supernatanti dei linfociti T CD8+ delle scimmie di inibire l'infezione acuta nelle cellule CEM x 174 infettate con il virus chimerico SHIV 89.6P o di controllare la riattivazione dell'infezione cronica nelle cellule OM-10-1 cronicamente infettate da HIV-1 (Tabella 7). In generale si osserva un'attività CAF maggiore nelle scimmie vaccinate rispetto al controllo.

TABELLA 7

Analisi della presenza di attività antivirale solubile mediata dalle cellule T CD8+ (CAF)^a

N° scimmia	Settimana dall'inizio dell'immunizzazione	% di inibizione della replicazione virale	
		Infezione acuta	Infezione cronica
M1	22	89.5	ND
	27	62	61,7
	37	ND	ND
M2	22	44	ND
	27	54	27
	37	48	53
M3	22	24	ND
	27	37	22
	37	75	23

^aCellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) erano isolate mediante gradiente di Ficoll dalle scimmie immunizzate con 100 μ g (M1) e 10 μ g (M2) di proteina Tat ricombinante e dalla scimmia di controllo (M3) non inoculata. Colture di linfociti T arricchite in cellule CD8+ erano isolate dai PBMC tramite l'uso di biglie magnetiche adsorbite con un anticorpo anti-CD8 (Dynabeads, Dynal, Norway), secondo le istruzioni della ditta. La purezza delle colture era controllata mediante analisi al FACS utilizzando un pannello di anticorpi diretti contro marcatori cellulo-specifici (CD3, CD4 e CD8). Le colture arricchite in linfociti CD8+ erano

seminate (in duplicato) a 5×10^5 cellule/500 μ l per pozzetto in piastre da 48 pozzetti, precedentemente adsorbiti per 12 ore a 4° C con un anticorpo monoclonale anti-CD3 (2.5 μ g/ml, BioSource International, Camarillo, CA) e cresciute in terreno RPMI 1640, contenente il 10% di siero fetale bovino e IL-2 (20 U/ml). 250 μ l di terreno erano raccolti ogni 3 giorni, per due settimane, e sostituiti con un uguale volume di terreno fresco. I supernatanti erano centrifugati, filtrati con filtri di 0.45 μ m e conservati a -80° C. I supernatanti dei diversi prelievi, ad eccezione del primo prelievo, erano uniti e la presenza di attività antivirale era saggiata come la capacità dei supernatanti di inibire la replicazione virale in due sistemi, rispettivamente di infezione acuta e di infezione cronica. Per il sistema di infezione acuta è stata utilizzata la linea di cellule CEM x 174, che deriva dalla fusione della linea umana di cellule B 721.174 con la linea umana di cellule T CEM [Salter et al., Immunogenetics 21:235 (1985)]. Le cellule (2×10^5) erano incubate in tubi di polipropilene in presenza o assenza di 200 μ l dei supernatanti, raccolti come appena descritto, per 2 ore a 37° C, e quindi infettate con 500 TCID₅₀ del virus chimerico SHIV 89.6P per 2 ore a 37° C. Le cellule erano lavate 3 volte con terreno fresco, seminate alla concentrazione di 2×10^4 cellule per pozzetto, in piastre da 96 pozzetti, ed incubate, in un volume finale di 200 μ l, in assenza (cellule non trattate) o in presenza (cellule trattate) di diverse quantità (50 μ l, 5 μ l, 0.5 μ l) di terreno di coltura dei linfociti T CD8+ delle scimmie vaccinate o della scimmia di controllo. Ogni tre giorni dopo l'infezione aliquote dei terreni di coltura

erano prelevati e sostituiti con un uguale volume di terreno completo a cui era aggiunto il supernatante derivato dai linfociti CD8+ delle scimmie vaccinate. I risultati riportati in tabella sono relativi al giorno 7 dopo l'infezione e sono espressi come percentuale (%) di inibizione della replicazione virale nelle cellule trattate con i supernatanti dei linfociti CD8+ derivati dalle scimmie vaccinate rispetto alle cellule non trattate. Per analizzare la replicazione virale si determinavano i valori di RT, come descritto [Goletti et al., J. Virol. 69:2540 (1995)], o di p27 Gag con saggi ELISA nei terreni raccolti ai diversi tempi. Per il sistema di infezione cronica si utilizzava la linea OM-10-1 [Butera et al., J. Virol. 65:4645 (1991); Butera et al., J. Virol. 68:2726 (1994)], che è una linea umana di linfociti T cronicamente infettata con HIV-1. A tale scopo le cellule erano seminate (in doppio) alla concentrazione di 5×10^4 cellule/200 μ l per pozzetto, in piastre da 96 pozzetti, in presenza di anticorpi anti-TNF β (40 μ g/ml), in assenza o in presenza di diversi volumi (50 μ l, 5 μ l, 0.5 μ l) di supernatante derivato dai linfociti CD8+ delle scimmie vaccinate o di controllo. Le cellule erano attivate con l'aggiunta di PMA (10^{-7} M). Aliquote dei terreni di coltura erano raccolte il giorno successivo alla attivazione per determinare i livelli di espressione virale, che era analizzata ricercando la presenza di RT o p24 Gag con saggi ELISA. I risultati sono espressi come % di inibizione della riattivazione dell'infezione nelle cellule trattate rispetto alle cellule non trattate. I risultati degli esperimenti di infezione acuta e cronica riportati nella tabella sono relativi ai campioni trattati con 5 μ l di supernatante dei linfociti CD8+. ND: non determinato.

Per quello che riguarda la valutazione della ipersensibilità di tipo ritardato (DTH, risposta di tipo Th1) valutata mediante skin test, sia le scimmie vaccinate (M1 e M2) che quella di controllo (M3) sono risultate negative (Tabella 8).

TABELLA 8
Skin-test al Tat^a

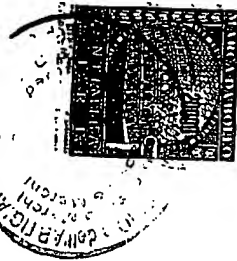
Settimane dopo l'immunizzazione	Scimmie		
	M1	M2	M3
10	-	-	-
15	-	-	-
22	-	-	-
27	-	-	-
32	-	-	-
37	-	-	-

^aTat (1 e 5 mg) in 150 ml di PBS-0.1% BSA od il suo tampone venivano inoculati per via intradermica in un'area tricotomizzata del dorso degli animali vaccinati e nella scimmia di controllo (controllo di specificità della risposta) alla 10^a, 15^a, 22^a, 27^a, 32^a e 37^a settimana dopo il primo inoculo vaccinale. Le scimmie M1 e M2 erano inoculate con la proteina Tat ricombinante (100 mg o 10 mg, rispettivamente) risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI, ed inoculata per via sottocutanea in un sito. La scimmia M3 è una scimmia di controllo non inoculata. La

comparsa di un nodulo eritematoso dopo 48 - 72 ore indicava la presenza di ipersensibilità di tipo ritardato (DTH): ++, $\varnothing \geq 5$ mm; + $\varnothing \geq 1-4$ mm; +/-, eritema senza indurimento; -, $\varnothing < 1$ mm.".

Postilla 54: Pagina 45 della descrizione: Riga 14: dopo la parola "mediata" inserire "con effetti antivirali."

H 02.03.99



Postilla 55: Pagina 45 della descrizione: Riga 15: **sostituire "2" con "M2".**

Postilla 56: Pagina 45 della descrizione: Riga 18: **radiare da "In un esperimento..." a "indotta da" e inserire "Sulla base di questi risultati è stato disegnato il secondo esperimento in cui abbiamo valutato l'effetto dell'immunizzazione indotta da 10 µg di "**

Postilla 57: Pagina 45 della descrizione: Riga 21: **sostituire "1-3" con M1-3".**

Postilla 58: Pagina 45 della descrizione: Riga 23: **sostituire "4-6" con "M4-6".**

Postilla 59: Pagina 45 della descrizione: Ultima Riga: **sostituire "7" con "M7".**

Postilla 60: Pagina 46 della descrizione: Riga 1: **sostituire "8" con "M8" e dopo la parola "autologo" aggiungere: "(controllo)".**

Postilla 61: Pagina 46 della descrizione: Riga 5: dopo "11" **radiare da "e 15 settimane..." fino a "esperimento pilota." e inserire: "15, 21, 28 e 32 settimane. Alla 36ª settimana le scimmie M1-M6 ricevevano l'ultimo richiamo con la proteina Tat ricombinante (15 mg) risospesa in 200 µl**

di Iscom (immune stimulating complex) e 300 µl di PBS. L'Iscom è un adiuvante composto dalla saponina Quil A, colesterolo e fosfolipidi in grado di incrementare la risposta umorale e cellulare [Morein et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 10:S109 (1994); Lövgren et al., Vaccine 14:753 (1996)]. Le scimmie M7 e M8 erano inoculate agli stessi tempi solo con gli adiuvanti. Negli stessi giorni dell'inoculazione

dell'immunogeno e alla 40^a, 44^a e 50^a settimana, venivano prelevati campioni di 10 ml di sangue per eseguire gli esami descritti nel primo esperimento pilota. Inoltre, venivano prelevati campioni di urine ed eseguiti tamponi vaginali per determinare la presenza di IgA secretorie specifiche. Per valutare l'effetto protettivo della vaccinazione è stato effettuato il challenge delle scimmie, vaccinate e di controllo, alla 50^a settimana dall'inizio dell'immunizzazione, mediante inoculazione per via endovenosa di 10 MID₅₀ (50% monkey infectious dose) di "simian-human immunodeficiency virus" (SHIV), ceppo 89.6P e contenente il gene tat di HIV cresciuto e titolato in *Macaca fascicularis* [Reimann et al., J. Virol. 70: 3198 (1996); Reimann et al., J. Virol. 70: 6922 (1996); Karlsson et al., J. Virol. 71: 4218 (1997)]. Il monitoraggio post-challenge (ogni 2 settimane a partire dal giorno del challenge per il primo mese, ogni 4 settimane per i successivi 3 mesi, ed ogni 8 settimane fino a 6-12 mesi dal challenge) include anche l'analisi di parametri virologici quali la determinazione dei valori plasmatici di p27 ed il carico virale nel plasma e nelle cellule. Per confermare l'avvenuta esposizione al virus è stata effettuata la ricerca degli anticorpi anti-SIV mediante kit commerciale per il rilevamento degli anticorpi anti-HIV-2

che riconosce anche anticorpi anti-SIV (Elavia Ac-Ab-Ak II kit, Diagnostic Pasteur, Paris, France).".

Postilla 62: Pagina 46 della descrizione: Riga 19: dopo la parola "disponibili" **radiare:** "e relativi alla 15a settimana dall'inizio della vaccinazione,".

Postilla 63: Pagina 47 della descrizione: Riga 2: dopo "da" **radiare** "1:12.800 a titoli maggiori di 1:50.000 (figure 4-6). Inoltre" e **inserire** "1:6.400 a 1:25.600 (figure 5-7). Tali anticorpi erano diretti principalmente contro la regione amino terminale (aa 1-20) di Tat, con titoli compresi tra 1:1600 a 1:3200 (figura 8) come evidenziato alla 22a settimana. Erano evidenziati anche anticorpi diretti contro la regione compresa tra gli aa 46-60 di Tat, con titoli compresi tra 1:100 e 1:200 (figura 8).

Postilla 64: Pagina 47 della descrizione: Riga 5: dopo le parole "trattate con" **radiare** da "la proteina Tat esogena" fino a Riga 7 di Pagina 55 della descrizione e **inserire** "diverse quantità della proteina Tat esogena, come precedentemente descritto per il primo esperimento pilota. Tali saggi hanno dimostrato che i sieri delle scimmie M1-6 (immuni) diluiti 1:2, ottenuti alla 15^a settimana dal primo inoculo, erano in grado di bloccare la replicazione virale indotta da 30 ng/ml di Tat esogeno, misurata tramite determinazione dell'antigene p24 nel terreno di crescita delle cellule, mentre il siero delle stesse scimmie al tempo 0 (preimmune) o i controlli negativi non avevano attività bloccante verso

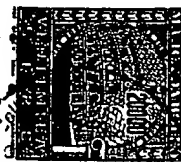
il Tat (Tabella 9). Inoltre, i sieri delle scimmie M1-6, diluiti 1:2, ottenuti alla 21^a settimana, erano in grado di bloccare la replicazione virale indotta da 60 ng/ml, 120 ng/ml, 240 ng/ml e 500 ng/ml di Tat esogeno. In particolare, erano ancora in grado di ridurre di circa 10 volte la replicazione virale indotta da dosi molto elevate di Tat (240 ng/ml e 500 ng/ml) (Tabella 9).

TABELLA 9

*Attività neutralizzante dei sieri sul "rescue" dell'infezione virale indotta da Tat extracellulare**

Campioni	Inibizione (%)
Tat (30 ng/ml)+ Siero preimmune M1	0
Tat (30 ng/ml)+ Siero preimmune M2	0
Tat (30 ng/ml)+ Siero preimmune M3	0
Tat (30 ng/ml)+ Siero preimmune M4	0
Tat (30 ng/ml)+ Siero preimmune M5	0
Tat (30 ng/ml)+ Siero preimmune M6	0
Tat (30 ng/ml)+ Siero immune M1 (week 15)	89,8
Tat (30 ng/ml)+ Siero immune M2 (week 15)	78,7
Tat (30 ng/ml)+ Siero immune M3 (week 15)	100
Tat (30 ng/ml)+ Siero immune M4 (week 15)	100
Tat (30 ng/ml)+ Siero immune M5 (week 15)	70,8
Tat (30 ng/ml)+ Siero immune M6 (week 15)	94,2
Tat (60 ng/ml)+ Siero preimmune M1	0
Tat (60 ng/ml)+ Siero preimmune M2	0
Tat (60 ng/ml)+ Siero preimmune M3	0
Tat (60 ng/ml)+ Siero preimmune M4	0
Tat (60 ng/ml)+ Siero preimmune M5	0
Tat (60 ng/ml)+ Siero preimmune M6	0
Tat (60 ng/ml)+ Siero immune M1 (week 21)	96,3
Tat (60 ng/ml)+ Siero immune M2 (week 21)	100
Tat (60 ng/ml)+ Siero immune M3 (week 21)	100
Tat (60 ng/ml)+ Siero immune M4 (week 21)	98,7
Tat (60 ng/ml)+ Siero immune M5 (week 21)	99
Tat (60 ng/ml)+ Siero immune M6 (week 21)	98,8
Tat (120 ng/ml)+ Pool sieri preimmuni M1-6	0
Tat (120 ng/ml)+ Siero immune M1 (week 21)	59,2
Tat (120 ng/ml)+ Siero immune M2 (week 21)	90,4
Tat (120 ng/ml)+ Siero immune M3 (week 21)	96,8
Tat (120 ng/ml)+ Siero immune M4 (week 21)	98,3
Tat (120 ng/ml)+ Siero immune M5 (week 21)	100
Tat (120 ng/ml)+ Siero immune M6 (week 21)	97,8
Tat (240 ng/ml)+ Pool sieri preimmuni M1-6	0
Tat (240 ng/ml)+ Siero immune M1 (week 21)	26,1
Tat (240 ng/ml)+ Siero immune M2 (week 21)	49,4

HO



Tat (240 ng/ml)+ Siero immune M3 (week 21)	70,3
Tat (240 ng/ml)+ Siero immune M4 (week 21)	91,2
Tat (240 ng/ml)+ Siero immune M5 (week 21)	94,5
Tat (240 ng/ml)+ Siero immune M6 (week 21)	86
Tat (500 ng/ml)+ Pool sieri preimmuni M1-6	0
Tat (500 ng/ml)+ Siero immune M1 (week 21)	32,7
Tat (500 ng/ml)+ Siero immune M2 (week 21)	38,9
Tat (500 ng/ml)+ Siero immune M3 (week 21)	57,5
Tat (500 ng/ml)+ Siero immune M4 (week 21)	89,4
Tat (500 ng/ml)+ Siero immune M5 (week 21)	72
Tat (500 ng/ml)+ Siero immune M6 (week 21)	71,8

**L'attività neutralizzante degli anticorpi anti-Tat è stata determinata in cellule HLM-1, come descritto nella Tabella 4. La proteina Tat ricombinante (30 ng/ml, 60 ng/ml, 120 ng/ml, 240 ng/ml e 500 ng/ml) era aggiunta da sola o in presenza di un ugual volume di siero delle scimmie prelevati al tempo 0 (sieri preimmuni) o alla 15^a e 21^a*

settimana (sieri immuni). Le scimmie M1-3 erano inoculate con 10 mg di Tat ricombinante risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di

~~*RIBI; le scimmie M4-6 erano inoculate con 10 mg di Tat ricombinante*~~

risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di Alum; due scimmie di controllo erano inoculate con RIBI (250 ml e 250 ml di siero autologo) (M7) o con Alum (250 ml e 250 ml di siero autologo) (M8). I risultati sono espressi come descritto nella Tabella 4.

L'attività neutralizzante il Tat, rilasciato durante l'infezione, da parte dei sieri delle scimmie veniva saggiata in cellule CEM x 174 infettate con il virus chimerico SHIV 89.6P. I risultati indicano che al 7° giorno dopo l'infezione il virus replicava nel 50% delle cellule di controllo infettate e coltivate in presenza dei sieri preimmuni delle scimmie M1-6, mentre non si osservava replicazione virale nelle cellule infettate e cresciute in presenza dei sieri immuni prelevati alla 44ª settimana (Tabella 10).

TABELLA 10

Attività neutralizzante dei sieri sulla propagazione dell'infezione virale^a

Campione	SHIV p27 (pg/ml)
SHIV + Siero preimmune M1	Neg
SHIV + Siero preimmune M2	Neg
SHIV + Siero preimmune M3	1,080
SHIV + Siero preimmune M4	0,602
SHIV + Siero preimmune M5	1,169
SHIV + Siero preimmune M6	Neg
SHIV + Siero immune M1	Neg
SHIV + Siero immune M2	Neg
SHIV + Siero immune M3	Neg
SHIV + Siero immune M4	Neg
SHIV + Siero immune M5	Neg
SHIV + Siero immune M6	Neg

^aCellule CEM x 174 (3×10^4 cellule/150 μ l) in piastre da 96 pozzetti

erano infettate con il virus chimerico SHIV 89.6P (5×10^5

TCID₅₀/cellula) per 2 ore a 37° C in RPMI 1640 contenente il 10% di

siero fetale bovino. Le cellule venivano lavate 2 volte con RPMI 1640 e

risospese in 150 μ l di terreno completo a cui veniva aggiunto il 5% di

siero prelevato al tempo 0 (preimmune) o alla 44ª settimana (immune)

delle scimmie vaccinate con la proteina Tat (10 μ g) e RIBI (M1-3) o

Alum (M4-6). I plasmi erano stati precedentemente scomplementati a

56° C per 30' e analizzati mediante ELISA per controllare il titolo degli

anticorpi anti-Tat. Ogni siero era saggiato in doppio. Nei giorni 3, 5 e 7 successivi all'infezione venivano prelevati 120 μ l di terreno che era sostituito con un uguale volume di terreno fresco a cui veniva aggiunto ogni volta il 5% di siero preimmune o immune delle scimmie M1-6. La capacità dei sieri di neutralizzare il Tat extracellulare, rilasciato durante l'infezione, e la propagazione dell'infezione in vitro era valutata ricercando la presenza di virus nei terreni di coltura mediante saggi ELISA per l'antigene p27 Gag (Coulter International, Miami, FL). I risultati, rappresentati come valori di p27 (pg/ml), corrispondono alla media dei valori ottenuti da due pozzetti per ciascun campione al giorno 7 dopo l'infezione.

Era inoltre evidente una risposta proliferativa specifica al Tat a partire dall'11^a settimana (Tabella 11).

TABELLA 11

Risposta proliferativa al Tat^a

N° scimmia	Stimolo	Settimane dall'inizio della immunizzazione									
		0	11	15	21	28	32	36	40	44	50
M1	PHA	16,96	10,50	15,27	33,8	7,2	51,5	64,3	36,05	24	65,7
	TT	11,69	1,96	3,01	1,2	1,2	1,3	0,93	1,4	10,05	7,2
	Tat	1,12	1,55	0,52	1,7	0,8	0,8	0,6	0,7	9,27	4,7
M2	PHA	31,27	25,75	21,28	87,1	25,7	56	38,2	40,3	29,03	26
	TT	1,12	1,8	0,57	1,7	1,15	1,6	4,95	1,2	1,51	2,9
	Tat	1,08	3,65	6,22	14,14	3,5	1,8	4,1	1,9	7,67	13,2
M3	PHA	22,42	7,89	16,88	36,3	148,5	42	78,9	27	53,71	ND
	TT	11,43	0,95	1,71	1,25	1,2	1,1	1	1	1,81	ND
	Tat	1,65	2,69	18,82	23,51	12,03	0,9	1,3	0,5	23,85	ND

H 02.03.99

M4	PHA	3,88	20,77	15,22	83,7	18,6	35	38,2	45,2	57,47	15,8
	TT	2,85	4,49	9,07	6,9	15,8	3,7	3,8	5	1977	6,6
	Tat	1,29	3,01	3,24	7,9	10,1	2,6	1,5	3,9	33,61	4,7
M5	PHA	6,25	5,74	16,74	72,2	7,45	41	56,5	32,9	33,85	12
	TT	2,31	1,07	4,84	3,9	0,9	0,83	1,4	1,24	10,22	1,95
	Tat	1,80	0,66	1,76	3,6	2,22	0,8	1,14	1,3	1,33	1,4
M6	PHA	11,96	17,94	2,77	29,4	7,3	25	8,3	6,85	18,01	5,2
	TT	4,14	1,71	0,13	1,7	10,34	1,3	1,8	1,1	24,9	0,9
	Tat	1,37	1,06	0,11	2,95	9,3	1,13	1,3	1	5,8	0,3
M7	PHA	21,65	20,30	37,93	17,6	17,9	75	12,9	34,8	41,81	27,5
	TT	0,97	0,80	0,88	1	0,6	1,04	0,6	0,4	1,11	1,1
	Tat	1,78	0,68	0,73	1	0,42	0,9	0,5	0,8	1,07	0,4
M8	PHA	26,51	67,09	16,38	14,9	17,2	28,2	18,95	20,6	28,61	13,6
	TT	1,20	10,78	0,20	1,6	0,62	0,8	1,2	0,9	1,11	2,1
	Tat	1,12	0,00	0,21	1,03	0,57	0,6	0,5	0,9	1,04	1

^aLinfociti di sangue periferico venivano isolati, stimolati con PHA (4

mg/ml), il tossoide tetanico (TT) (10mg/ml) e Tat (1 o 5 mg/ml) e

saggiati come descritto in Tabella 5. Le scimmie M1-3 erano inoculate

con 10 mg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 ml di siero

autologo e 250 ml di RIBI; le scimmie M4-6 erano inoculate con 10 mg

di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 ml di siero autologo e 250

ml di Alum; due scimmie di controllo venivano inoculate con RIBI (250

ml e 250 ml di siero autologo) (M7) e con Alum (250 ml e 250 ml di

siero autologo) (M8). ND, non determinato.

Una forte risposta di linfociti T citotossici (CTL) era evidente in una

scimmia immunizzata con la proteina Tat e RIBI (M1) e in due scimmie

vaccinate con la proteina Tat e Alum (M4 e M5), mentre una risposta

H 02.03.99

CTL più debole era evidente nella scimmia M6 inoculata con Tat e Alum (figura 9 e Tabella 12).

TABELLA 12

*Analisi della presenza di CTL**

N° Scimmia	Settimana	Rapporto bersaglio/effettore						Media	
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Media		
M1	28	5,9	4,7	4,1	7,9	5,3	5,5	+	
	36	ND	14,4	8,8	4,9	6,7	8,7	+	
M2	28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
M3	28	0	0	0	0	0	0	-	
	36	ND	0	0,6	0,5	2,0	0,7	-	
M4	28	0	0	1,1	1,1	2,6	0,9	-	
	36	ND	2,7	8,3	15	1,9	6,9	+	
M5	28	4,9	3,9	4,7	5,5	1,7	4,1	+	
	36	0	1	0	0	0	0,2	-	
M6	28	0	2,6	1,1	7,2	7,2	3,6	+/-	
	36	ND	0	0	0	0	0	-	
M7	36	0	0	0	0	0	0	-	
M8	36	0	0	0	0	0	0	-	

*Il saggio era eseguito come descritto nella Tabella 6. Le scimmie M1-3

erano inoculate con 10 mg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI; le scimmie M4-6 erano inoculate con 10 mg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di Alum; due scimmie di controllo venivano inoculate con RIBI (250 ml e 250 ml di siero autologo) (M7) e con Alum

(250 ml e 250 ml di siero autologo) (M8). ND, non determinato.

Era osservata la presenza di attività antivirale totale (TAA) alla 44a settimana, valutata come la capacità dei PBMC delle scimmie vaccinate con la proteina Tat, coltivati in presenza di siero autologo, di resistere all'infezione con il virus chimerico SHIV 89.6P (Tabella 13).

H 02.03.99

TABELLA 13

*Analisi della presenza di attività antivirale totale (TAA)**

N° Scimmia	Giorni dopo l'infezione	
	7	17
	Dose infettante minima (TCID ₅₀ /cellula)	Dose infettante minima (TCID ₅₀ /cellula)
M1	10 ⁻²	10 ⁻²
M2	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
M3	10 ⁻³	10 ⁻³
M4	10 ⁻²	10 ⁻²
M5	10 ⁻²	10 ⁻²
M6	10 ⁻³	10 ⁻³
M7	10 ⁻³	10 ⁻³
M8	10 ⁻⁴	10 ⁻³

*I PBMC erano prelevati alla settimana 44 dalle scimmie vaccinate con la proteina Tat ricombinante (10 µg) in presenza dell'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum (M4-6) e dalle scimmie di controllo inoculate con RIBI (M7) o Alum (M8). I PBMC, purificati mediante gradiente di Ficoll e seminati in triplicato alla concentrazione di $5 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ per pozzetto in piastre da 48 pozzetti, erano cresciuti in RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino e il 5% di siero autologo scomplementati, in presenza di un anticorpo monoclonale anti-CD3 (5 ng/ml) ed IL-2 (2U/ml), per 48-72 ore a 37° C. Le cellule erano quindi infettate con diverse dosi del virus chimerico SHIV 89.6P (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ TCID₅₀/cellula) per 2 ore a 37° C, lavate 3 volte con PBS-A e risospese in 50% di terreno condizionato e 50% di terreno fresco alla concentrazione di $5 \times 10^5/\text{ml/pozzetto}$. Nei giorni 3, 7, 10, 14 e 17 dopo l'infezione, aliquote dei terreni di coltura erano prelevate per la valutazione della replicazione virale e sostituite con uguali volumi di terreno fresco. La replicazione virale era valutata ricercando nel terreno

di coltura l'antigene p27 Gag di SIV tramite saggio ELISA (Coulter International, Miami, FL). I risultati sono relativi ai giorni 7 e 17 dopo l'infezione e sono riportati come la dose minima di SHIV (TCID₅₀/cellula) con cui le cellule sono state infettate.

I risultati dimostrano la presenza di attività antivirale solubile mediata dai linfociti T CD8⁺ (CAF) (Tabella 14). In genere si osserva un incremento maggiore dell'attività CAF nelle scimmie vaccinate rispetto ai controlli.

TABELLA 14

Analisi della presenza di attività antivirale solubile mediata dalle cellule T CD8⁺ (CAF) *

N° scimmia	Settimane dopo l'inizio della vaccinazione	% di inibizione della replicazione virale	
		Infezione acuta	Infezione cronica
M1	0	8	30
	32	53	53
M2	0	36	0
	32	60	27
M3	0	0	37
	32	55	29
M4	0	45	0
	32	85	66
M5	0	41	0
	32	ND	ND
M6	0	49	18
	32	34	41,4
M7	0	39	39
	32	71	44
M8	0	37	0
	32	76	26,8

Analisi della presenza di attività antivirale solubile mediata dalle cellule

T CD8⁺ (CAF) delle scimmie immunizzate con la proteina Tat (10 µg) in presenza dell'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum (M4-6), e delle scimmie di controllo inoculate con RIBI (M7) o Alum (M8). L'infezione acuta era saggiata nelle cellule CEM x 174 infettate con lo SHIV 89.6P.

L'esecuzione del saggio era condotta come descritto nella Tabella 7 e i risultati sono relativi al giorno 7 dopo l'infezione. La presenza di attività CAF sull'infezione cronica era saggiata nella linea cellulare U1 [Folks et al. Science 238:800 (1987)], che è una linea umana promonocitica cronicamente infettata con HIV-1. Le cellule U1, seminate alla concentrazione di 1×10^4 cellule/200 μ l per pozzetto in piastre da 96 pozzetti, erano incubate con PMA (10^{-8} M) per indurre la riattivazione dell'infezione di HIV-1, in assenza o in presenza di diversi volumi (50 μ l, 5 μ l, 0.5 μ l) del terreno di coltura dei linfociti T CD8+ delle scimmie vaccinate o delle scimmie di controllo. Tre giorni dopo l'induzione, la presenza di HIV-1 era ricercata nel terreno di coltura mediante la determinazione dei valori di RT virale o p24 Gag. I risultati sono riportati come % di inibizione della replicazione virale nelle cellule trattate con i supernatanti dei linfociti CD8+ rispetto alle cellule non trattate. I risultati degli esperimenti di infezione acuta e cronica riportati nella tabella sono relativi ai campioni trattati con 5 μ l di supernatante dei linfociti CD8+.

Era analizzata la produzione di citochine (γ IFN, IL-4, $\text{TNF}\alpha$) e della chemochina Rantes da parte dei PBMC delle scimmie vaccinate con la

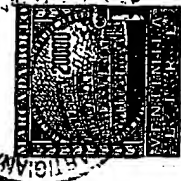
proteina Tat e l'adiuvante RIBI (M1-3) o Tat e l'adiuvante Alum (M4-6) e delle scimmie di controllo M7 ed M8 (Tabella 15).

TABELLA 15

Analisi della produzione di citochine e chemochine^a

N° scimmia	Controllo				PHA				TT			
	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes
M1	-/-	-/-	-/-	-/-	988/1096	-/-	948/-	1788/2564	-/-	-/3.8	-/-	nd/nd
M2	-/-	-/-	125/-	-/-	325/280	-/-	244/172	292/284	86/66	-/-	-/-	nd/nd
M3	Nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	Nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	Nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd
M4	-/-	-/-	-/-	-/-	426/66	-/-	98/-	-284	-/-	-/-	-224	nd/nd
M5	-/-	-/-	48/-	-/-	279/303	-/-	416/-	536/608	-/-	-/-	-/-	nd/nd
M6	-/-	-/-	-/-	246/-	255/137	-/-	-/-	1124/268	-/-	-/-	-266	nd/nd
M7	-/-	-/-	-/-	-/-	150/169	-/-	40/-	1228/976	-/-	-/4	-nd	nd/nd
M8	-/-	-/-	-/-	-/-	0/0	20/32	60/-	2160/1588	-/-	-/-	-nd	nd/nd

N° scimmia	Tat (1 µg)				Tat (5 µg)			
	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes
M1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	16/-	-/-
M2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
M3	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	Nd/nd	Nd/nd	nd/nd	nd/nd
M4	-/-	-/-	378/430	-/-	-/-	-/-	344/352	-/-
M5	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
M6	-/-	-/5	-/-	-/-	-78	-/-	150/-	-/-
M7	-/40	-/3.3	84/-	-/-	-/-	-/3.2	-/-	-/-
M8	-/-	-/4.8	-/-	-/-	-/-	-/10	-/-	-/-



**Analisi della produzione di citochine e chemochine a 48 e 96 ore di coltura (48/96) da parte di PBMC delle scimmie vaccinate con 10 mg di proteina Tat ricombinante con l'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum (M4-6). Le scimmie di controllo (M7 ed 8) erano state inoculate solo con l'adiuvante RIBI o Alum, rispettivamente. I PBMC, prelevati alla settimana 44 dall'inizio dell'immunizzazione e purificati mediante gradiente di Ficoll, erano seminati alla concentrazione di 1×10^6 cellule/ml per pozzetto in piastre da 24 pozzetti e cresciuti, in RPMI 1640 contenente il 10% di siero fetale bovino, non stimolati (controllo), per valutare il rilascio spontaneo di citochine o chemochine, oppure stimolati con PHA ($2 \mu\text{g/ml}$), il tossoide del tetano (TT, $5 \mu\text{g/ml}$) o Tat (1 o $5 \mu\text{g/ml}$). Aliquote dei terreni di coltura erano raccolte 48 e 96 ore dopo la stimolazione per la determinazione della presenza di citochine e chemochine, che veniva eseguita utilizzando kits ELISA commerciali della ditta BioSource International (Camarillo, CA, USA) per la determinazione delle citochine, e della Ditta R&D Systems (Abingdon, Oxon, UK) per la quantificazione di Rantes. I risultati sono riportati come valori (pg/ml) delle citochine o di Rantes a 48 e 96 ore (48/96), rispettivamente. I valori di cut off erano (pg/ml): γIFN , 31.2; IL-4, 3.12;*

TNF α , 15.6; Rantes, 62.5. (-), i valori erano inferiori ai rispettivi valori di cut off. nd, non determinato.

Inoltre, alla 15^a settimana 5 scimmie inoculate con la proteina ricombinante (scimmie M2-6) reagivano allo skin test con Tat, con una forte reazione di ipersensibilità ritardata (Tabella 16 e figura 10). Nelle

scimmie 4 e 5 la reazione allo "skin-test" diventava ancora più evidente nelle settimane successive (Tabella 16).

TABELLA 16
Skin-test al Tat ^a

N° scimmia	Settimane dall'inizio dell'immunizzazione						
	11	15	21	28	32	36	44
M1	-	-	-	-	-	-	-
M2	-	+	+	+/-	+/-	+	+/-
M3	+/-	+	+/-	+/-	-	-	-
M4	-	+	++	++	++	++	++
M5	+/-	+	++	+	++	++	+
M6	-	+	+/-	+/-	-	-	-
M7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aTat (1 e 5 mg) in 150 ml di PBS-0.1% BSA od il suo tampone venivano inoculati per via intradermica in un'area tricotomizzata del dorso degli animali vaccinati ma non nei controlli (ND, non determinato) all'11^a, 15^a, 21^a, 28^a, 32^a, 36^a e 44^a settimana dopo il primo inoculo vaccinale. Le scimmie M1-3 erano inoculate con 10 mg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di RIBI; le scimmie M4-6 erano inoculate con 10 mg di proteina Tat ricombinante risospesa in 250 ml di siero autologo e 250 ml di Alum; due scimmie di controllo venivano inoculate con RIBI (250 ml e 250 ml di siero autologo) (M7) e con Alum (250 ml e 250 ml di siero autologo) (M8).

La comparsa di un nodulo eritematoso dopo 48 - 72 ore indicava la presenza di ipersensibilità di tipo ritardato (DTH): ++, $\varnothing \geq 5$ mm; + $\varnothing \geq 1-4$ mm; +/-, eritema senza indurimento; -, $\varnothing < 1$ mm.

I risultati post-challenge indicano che 4 su 6 (67%) degli animali vaccinati erano protetti dall'infezione con 10 MID₅₀ di SHIV89.6P,

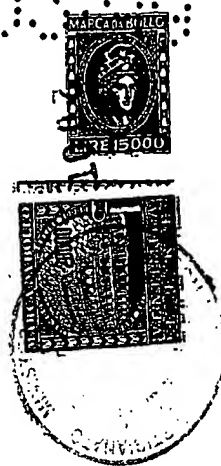
H 02.03.99

come indicato dai risultati dei tests virologici (Tabella 17). In particolare, nel plasma delle scimmie M1, M2, M4 e M6 non era rilevabile la presenza dell'antigene virale p27 Gag, nelle cellule di tali scimmie non era evidenziabile, mediante metodica di PCR, DNA provirale e la citoviremia era anche negativa. Le altre due scimmie vaccinate (M3 e M5) risultavano invece infette, come evidenziabile dalla presenza di p27 nel plasma e di DNA provirale nelle cellule e dal dato di citoviremia (Tabella 17). Entrambi i controlli (M7 ed M8) risultavano infetti sulla base degli stessi parametri virologici. A riprova della infettività della carica virale utilizzata per il challenge un'ulteriore scimmia naive (M13) è stata inclusa fra i controlli ed inoculata con 2.85 MID₅₀ di SHIV89.6P (3.5 volte inferiore alla dose usata per il challenge delle scimmie in protocollo) ed è risultata infetta. Per confermare l'avvenuta esposizione al virus e' stata inclusa la determinazione, già descritta in questo Esempio, degli anticorpi contro antigeni di SIV presenti nel virus chimerico SHIV89.6P (Gag, Pol, RT, Nef). La presenza di questi anticorpi nelle scimmie risultate negative agli esami virologici conferma l'avvenuta esposizione al virus, o l'infezione abortiva del virus usato per l'inoculo. Per le scimmie con bassi titoli

anticorpali anti-SIV sarà valutata la produzione in vitro di IgG specifiche per il virus (IVAP) [Zamarchi et al., AIDS Res. Human Retrov. 9:1139 (1993); Fiore et al., AIDS 5:1034 (1991)] con la seguente metodica. Due milioni di PBMC vengono seminati in un pozzetto di una piastra da coltura da 24 pozzetti e stimolati con 2 mg/ml di fitolacca americana (PWM, Sigma, St. Louis, USA). Dopo 7

H 02:00

giorni di incubazione (a 37° C, con il 5% di CO₂, ed il 95% di umidità) sarà raccolto il supernatante per la determinazione degli anticorpi anti-SIV con la stessa metodica già riportata in questo Esempio. Ove necessario verranno effettuati tests di proliferazione linfocitaria in risposta ad antigeni di SIV analogamente a quanto fatto per il Tat di HIV-1, come riportato in questo Esempio.



H 02.03.99

TABELLA 17

Analisi dei parametri virologici

N° scimmia	Giorni dopo il challenge con il virus SHIV 89.P							
	15				30			
	p27 ^a (pg/ml)	DNA PCR (copie/ µg) ^b	Citoviremia ^c	IgG anti-SIV ^d	p27 (pg/ml)	DNA PCR (copie/ µg)	citoviremi a	IgG anti-SIV
M1	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2
M2	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2
M3	73,3	855	707,3	Neg	28,22	959	74,95	Neg
M4	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2
M5	964	1147	>2818,3	Neg	20,8	>10 ³	78	1:2
M6	<20	<1	Neg	1:8	<20	<1	Neg	1:8
M7	287,8	838	707,9	>1:50	65,2	858	354,8	>1:50
M8	106,7	376	707,9	1:2	<20	311	44,6	1:5
M13	1876	+f	+e	ND	<20	+f	ND	1:1600

Analisi dei parametri virologici dopo challenge delle scimmie vaccinate con 10 mg di proteina Tat ricombinante con l'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum (M4-6). Le scimmie di controllo (M7 ed 8) erano state inoculate solo con l'adiuvante RIBI o Alum, rispettivamente. La scimmia M13 era un animale naive infettato con 2.85 MID₅₀ di SHIV89.6P.

^aL'antigenemia plasmatica era determinata ricercando l'antigene p27 Gag di SHIV tramite ELISA (Innogenetics, Belgio) ed è espressa come valori di p27 (pg/ml). Neg, il valore era inferiore al valore di cut off (18 pg/ml).

^bIl DNA era estratto dal sangue intero utilizzando il kit QIAamp blood (Angiogen GmbH and Qiagen Inc., Hilden, Germany). La qualità del

~~DNA era controllata amplificando con PCR il gene della β -globina come~~

descritto [Saiki et al., Science 230:1350 (1985)]. La presenza del DNA provirale era ricercata mediante PCR semiquantitativa su 1 µg di DNA utilizzando i primers SG1096Ngag (nucleotidi 1096-1119 del genoma di

*SIVmac251: 5'TTAGGCTACGACCCGGCGGAAAGA3') e

SG1592CgagD (nucleotidi 1569-1592 del genoma di

Vmac251: 5'ATAGGGGGTGCAGCCTTCTGACAG3') che amplificano un frammento di 496 coppie di basi del gene gag di SHIV, come descritto [Titti et al., Cell. Pharmacol. AIDS 3:123 (1996)]. Per quantificare il numero di copie di DNA provirali, in ogni esperimento era inclusa una curva standard di riferimento utilizzando come DNA stampo il plasmide pCMRII- Δ gag (contenente una delezione di 100 coppie di basi del gene gag di SIVmac251) e i primers descritti sopra, che amplificano un frammento di 396 coppie di basi. I DNA amplificati erano analizzati mediante elettroforesi e quantificati mediante densitometria (Ultrascan LX Enhancer Laser, LKB, Bromma, Svezia). La relazione tra i valori di densità ottica e il numero di molecole del plasmide Δ gag era stabilito mediante analisi della regressione lineare (Statgraphics, Manugistics, Inc. Cambridge, MA). I valori di densità ottica erano lineari fino a 1000 molecole (coefficiente di correlazione = 0.954 ± 0.026). Il n° di copie di DNA provirale di SHIV/ μ g di DNA era determinato interpolando i valori di densità ottica dei campioni sulla curva di riferimento. Il limite di sensibilità del saggio era 1 copia di provirus / μ g di DNA.

~~La citoviremia era determinata in saggi di cocoltura nei quali 1×10^4~~

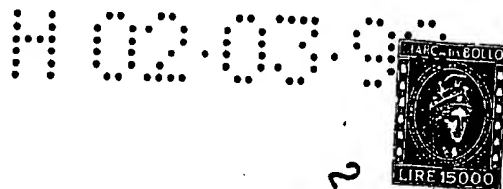
cellule della linea CEMx174 venivano coltivate in presenza di diluizioni scalari (da 1×10^6 a $3,9 \times 10^3$ cellule per pozzetto, per un totale di 12 diluizioni) dei PBMC in esame in micropiastre da 96 pozzetti. Al giorno 3, 7 e 10 post-infezione, 150 mL di terreno completo erano aggiunti in ciascun pozzetto dopo aver raccolto un ugual

volume di supernatante che veniva saggiato per la presenza della p27 Gag virale mediante test ELISA (Innogenetics, Belgio). I risultati ottenuti venivano analizzati con la formula di Reed e Muench per determinare il numero di PBMC infetti produttivamente per milioni di cellule totali.

^aLa presenza di anticorpi contro il virus SHIV era determinata sui plasmi delle scimmie saggiati in doppio a diverse diluizioni (1:2, 1:10, 1:50) utilizzando il kit Elavia Ac-Ab-Ak II kit (Diagnostic Pasteur, Paris, France), secondo le istruzioni della ditta. E' riportata l'ultima diluizione alla quale i valori dei campioni erano superiori al valore di cut off.

^aPer la scimmia M13 è stato effettuato l'isolamento virale invece della citoviremia. L'isolamento del virus era effettuato come segue. I PBMC (3×10^6) delle scimmie infettate con diverse dosi di SHIV 89.6P, purificati in gradiente di Ficoll, erano coltivati con cellule CEM x 174 (1×10^6) in 1 ml di terreno contenente il 10% di siero fetale bovino. Dopo 24 ore le cellule erano diluite alla concentrazione di 1×10^6 /ml e coltivate per 3 giorni. Quindi, si raccoglievano 2 ml di terreno e si riseminavano le cellule alla concentrazione di 3×10^5 /ml in 7 ml. Le cellule in eccesso erano scartate. Questa procedura era ripetuta due

volte alla settimana per 4 settimane. La presenza del virus era ricercata nel terreno di coltura, raccolto ai diversi tempi, determinando la presenza dell'antigene p27 Gag con saggio ELISA (Innogenetics, Belgio) e successivamente la presenza della trascrittasi inversa (RT). L'isolamento virale era considerato positivo (+) quando entrambi i saggi



(p27 ed RT) erano positivi in 3 campioni sequenziali. In caso contrario, l'isolamento era considerato negativo (-).

E' stata effettuata una DNA-PCR qualitativa.

I dati virologici trovavano piena rispondenza con la determinazione del numero assoluto dei linfociti CD4 che risultavano drasticamente diminuiti nelle scimmie risultate infette (M3, M5, M7, M8) come indicato in tabella 18.

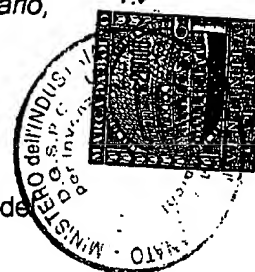


TABELLA 18
Analisi al FACS dei linfociti CD4+ e CD8+

N° scimmia	Giorni dopo il challenge con SHIV 89.6P											
	0			15			30			60		
	%			%			%			%		
	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+
	(cellule/ μ l)	(cellule/ μ l)		(cellule/ μ l)	(cellule/ μ l)		(cellule/ μ l)	(cellule/ μ l)		(cellule/ μ l)	(cellule/ μ l)	
M1	32,1 (1490)	53 (2460)	0,6	ND	ND	ND	30,8 (2420)	57,3 (4500)	0,54	30,6 (2460)	57,9 (4670)	0,53
M2	27,7 (1550)	45,3 (2530)	0,6	ND	ND	ND	35,5 (2120)	43,7 (2610)	0,81	29,6 (2000)	42,4 (2870)	0,7
M3	33 (1120)	39,3 (1340)	0,84	ND	ND	ND	3,1 (190)	75,6 (4660)	0,04	6,2 (240)	70 (2750)	0,09
M4	16,6 (670)	68,3 (2740)	0,24	ND	ND	ND	17,25 (2050)	68,7 (8180)	0,25	15,5 (1520)	75 (7350)	0,21
M5	36,3 (2770)	43,9 (3350)	0,83	ND	ND	ND	1,1 (90)	82,3 (1300)	0,01	4,1 (480)	75,5 (8730)	0,05
M6	35,3 (1210)	43,4 (1480)	0,81	ND	ND	ND	35,9 (1240)	45,5 (1570)	0,79	37,8 (3700)	43,7 (4280)	0,86
M7	36,1 (1610)	31,3 (1400)	1,15	ND	ND	ND	7,4 (480)	86,1 (4260)	0,11	13,7 (860)	56,7 (3550)	0,24
M8	25,7 (850)	51,3 (1710)	0,5	ND	ND	ND	3,3 (210)	76,2 (4840)	0,04	8,1 (580)	64,9 (4670)	0,13
M13	40,5 (2580)	39,7 (2544)	1,01	38,4 (434)	33,6 (380)	1,14	35,1 (1721)	32,2 (1479)	1,16	3,1 (111)	62,3 (2225)	0,05

Analisi al FACS dei linfociti CD4+ e CD8+ delle scimmie vaccinate con

10 mg di proteina Tat ricombinante con l'adiuvante RIBI (M1-3) o Alum

(M4-6). Le scimmie di controllo (M7 ed 8) erano state inoculate

solo con l'adiuvante RIBI o Alum, rispettivamente. La scimmia M13 era un animale naive infettato con 2.85 MID₅₀ di SHIV89.6P. L'analisi era eseguita al fluorescence-activated-cell-sorter (FACS) come descritto [Rosenberg et al., *Int. Immunol.* 9 (5):703 (1997)], utilizzando anticorpi monoclonali direttamente marcati (anti-CD4-FITC, BioSource; anti-CD8-PerCp, Becton-Dickinson). ND, non determinato. I risultati pre-challenge indicano che l'immunogeno Tat, nonché entrambi gli adiuvanti RIBI e Alum (o Iscom che è stato utilizzato come adiuvante nell'ultimo richiamo), erano ben tollerati dagli animali e non erano tossici, confermando i risultati relativi alla sicurezza e tollerabilità della vaccinazione con Tat ottenuti nel primo esperimento pilota. Inoltre, questi dati confermano l'osservazione preliminare riportata nel primo esperimento e forniscono ulteriori evidenze che la proteina ricombinante Tat induce una forte risposta umorale e cellulare specifica anti-Tat con effetti antivirali in vitro e in vivo. I risultati post-challenge (4/6 scimmie protette) confermano le aspettative dei risultati in vitro ed indicano che il vaccino anti-Tat proteico è in grado di indurre protezione dall'infezione e quindi dalla malattia. Il follow-up delle scimmie chiarirà analoghi effetti della vaccinazione sulla progressione della malattia nel caso delle due scimmie infettate.

Esempio 5.

H 02.03.99

**Inoculazione in *Macaca fascicularis* di un vaccino anti-Tat a DNA:
valutazione della sicurezza, tollerabilità, risposta immune specifica
e dell'efficacia protettiva al challenge virale."**

Postilla 65: Pagina 55 della descrizione: Riga 17: sostituire "PBS" con "PBS-A" e radiare "(senza Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺)".

Postilla 66: Pagina 55 della descrizione: Riga 18: dopo "sono" inserire "successivamente".

Postilla 67: Pagina 56 della descrizione: radiare da Riga 3 di pagina 56 a Riga 21 compresa di Pagina 58 della descrizione e inserire: "La tollerabilità, la sicurezza e la capacità di indurre una risposta immune specifica (umorale e cellulare) e l'efficacia protettiva al challenge virale del DNA del plasmide pCVTat erano valutate nelle scimmie cynomolgus (*Macaca fascicularis*). In un primo esperimento abbiamo utilizzato 3 scimmie secondo il seguente schema: la scimmia M1 era inoculata con 200 µg di DNA del plasmide pCVTat risospesi in 300 µl di PBS per via intradermica in 2 siti nel dorso vicino ai linfonodi ascellari (150 µl/sito); la scimmia M2 era inoculata con 500 µg di DNA del plasmide pCVTat risospesi in 500 µl di PBS per via intramuscolare in 2 siti nel dorso (250 µl/sito). Ai giorni 1 o 5 precedenti l'inoculazione intramuscolare, venivano inoculati 250 µl di soluzione fisiologica contenente lo 0.5% di bupivacaina e lo 0.1% di metilparabene, nei due siti, opportunamente marcati, in cui successivamente veniva eseguita

vaccinate e nel controllo non si erano osservate alterazioni significative dei parametri clinici, ematochimici e comportamentali. Non si riscontravano segni di infiammazione o neoformazioni vascolari nei siti di inoculazione. Questi risultati indicano che il DNA del plasmide

H 02.03.99

pCVTat era ben tollerato dagli animali e non era tossico alle dosi somministrate, utilizzando le vie di inoculazione scelte. Nella scimmia M1, vaccinata con 200 µg di DNA per via intradermica, erano presenti anticorpi IgG specifici anti-Tat a partire dalla 32^a settimana (Figura 11). I titoli anticorpali dalla 32^a alla 58^a settimana erano compresi tra 1:100 e 1:800 (Figura 12). La mappatura degli epitopi riconosciuti da questi anticorpi (effettuata come descritto nella legenda della Figura 4) evidenziava, alla 37^a settimana, reattività contro i peptidi di Tat corrispondenti agli aa 1-20, aa 46-60 e aa 65-80 con titoli rispettivamente di 1:200, 1:100 ed 1:50 (dati non mostrati). Nella scimmia M2, inoculata con 500 µg di DNA per via intramuscolare, gli anticorpi anti-Tat erano scarsamente evidenziabili (titolo 1:50, dato non mostrato) per tutto il periodo di studio. I risultati sono riportati nella figura 11. L'attività neutralizzante il Tat nel siero della scimmia M1, immunizzata con 200 µg di DNA per via intradermica, veniva saggiata mediante saggio di inibizione del "rescue" dell'infezione virale in cellule HLM-1 trattate con la proteina Tat esogena, come descritto nell'Esempio 4. Questo saggio ha dimostrato che il siero della scimmia

M1, diluito 1:2 e ottenuto alla 37^a settimana dal primo inoculo, riduceva la replicazione virale indotta da 30 ng/ml di Tat esogeno, mentre il siero della stessa scimmia prelevato al tempo 0 (preimmune) non bloccava il Tat (Tabella 19).

TABELLA 19

*Attività neutralizzante dei sieri sul "rescue" dell'infezione virale indotta da Tat extracellulare**

Campioni	Inibizione (%)
Tat + Siero preimmune M1	0
Tat + Siero immune M1	51

*L'attività neutralizzante degli anticorpi anti-Tat è stata determinata in cellule HLM-1 trattate con 30 ng/ml di proteina Tat ricombinante, pre-incubata con un uguale volume di siero prelevato al tempo 0 (siero preimmune) o alla 37^a settimana (siero immune) della scimmia M1, inoculata con 200 µg del plasmide pCVTat per via intradermica. Il saggio era eseguito ed i risultati espressi come descritto nella Tabella 4.

I risultati in Tabella 20 dimostrano la comparsa di una risposta proliferativa al Tat, alla 42^a settimana, nella scimmia M1 immunizzata con 200 µg di DNA per via intradermica, mentre nella scimmia M2 non era evidenziata tale tipo di risposta.

TABELLA 20

Risposta proliferativa al Tat^a

N° scimmia	Stimolo	Settimane dall'inizio dell'immunizzazione							
		15	22	27	32	37	42	48	58
M1	PHA	32,9	45	89,3	40,5	3,1	13,3	ND	13,1
	TT	0,8	2,7	1,5	1,3	0,6	9	1,2	1,6
	Tat	0,9	1,7	1,2	1,1	1,1	5,9	1	1
M2	PHA	11,7	18,5	21,8	32,2	1,1	6,2	7	18,9
	TT	0,9	1,8	0,8	1,1	1	1,5	1,1	1
	Tat	0,8	1,4	0,9	1,1	1,1	1,3	1,1	1
M3	PHA	5,1	19,9	18,2	6,6	8,1	77,8	ND	2,1
	TT	7,2	6,2	5,5	2,8	5,6	36,8	1	2,1
	Tat	2,1	1,4	2,2	0,7	1,5	2,8	0,8	0,9

^aLinfociti di sangue periferico venivano isolati, stimolati con PHA (4 mg/ml), tossoide tetanico (TT) e Tat (1 o 5 mg/ml) e saggiati come descritto nella Tabella 5. Le scimmie erano inoculate con 200 mg (M1) di DNA del plasmide pCVTat per via intradermica o con 500 mg (M2) di DNA di pCVTat per via intramuscolare. La scimmia di controllo (M3) non era inoculata. ND, non determinato.

L'attività citotossica (CTL) anti-Tat era rilevata nella scimmia M1 alla 48^a settimana e nella scimmia M2 alla 42^a settimana (Tabella 21).

TABELLA 21

Analisi della presenza di attività citotossica specifica per Tat (CTL)^a

N° Scimmia	Settimana	Rapporto bersaglio/effettore						Attività CTL
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Media	
M1	42	27,4	27,8	17,1	9,8	3,9	17,2	+
	48	ND	ND	21,3	0	11,7	11	+
M2	42	1,2	5,9	2,4	1	0	2,1	-
	48	ND	ND	ND	57	25,1	41	+

H 00:03:00



M3	42	1,8	0	0	1,2	0	0,6	-
	48	ND	ND	0	0	0	0	-

**Il saggio era eseguito come descritto nella Tabella 6. Le scimmie erano inoculate con 200 mg (M1) di DNA del plasmide pCVTat per via intradermica o con 500 mg (M2) di DNA di pCVTat per via intramuscolare. La scimmia di controllo (M3) non era inoculata. ND, non determinato.*

I risultati in Tabella 22 inoltre dimostrano la presenza di attività antivirale totale (TAA) in entrambe le scimmie vaccinate con 200 e 500 µg di DNA alla 52^a settimana.

TABELLA 22

Analisi della presenza di attività antivirale totale (TAA)^a

N° scimmia	Giorni dopo l'infezione	
	7	17
	Dose minima infettante (TCID ₅₀ /cellula)	Dose minima infettante (TCID ₅₀ /cellula)
M1	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
M2	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
M3	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸

**Il saggio era eseguito come descritto nella Tabella 13. Le scimmie erano inoculate con 200 mg (M1) di DNA del plasmide pCVTat per via intradermica o con 500 mg (M2) di DNA di pCVTat per via intramuscolare. La scimmia di controllo (M3) non era inoculata. I PBMC erano prelevati alla settimana 52 dall'inizio della vaccinazione ed erano infettati con 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸ TCID₅₀ di SHIV 89.6P. I risultati sono*

espressi come la dose minima di SHIV(TCID₅₀/cellula) a cui le cellule sono state infettate.

I risultati in Tabella 23 dimostrano la presenza di attività antivirale solubile CAF mediata dai linfociti T CD8+, alla 22^a e 27^a settimana in entrambe le scimmie vaccinate che è superiore rispetto alla scimmia di controllo.

TABELLA 23

Analisi della presenza di attività antivirale solubile mediata dalle cellule T CD8⁺ (CAF)^a

N° scimmia	Settimane dall'inizio della vaccinazione	% di inibizione della replicazione virale	
		Infezione acuta	Infezione cronica
M1	22	62	27
	27	56	25
M2	22	74	ND
	27	28	ND
M3	22	24	ND
	27	37	22

^aAnalisi della presenza di attività antivirale solubile prodotta dalle cellule

T CD8⁺ (CAF) delle scimmie inoculate con 200 µg (M1) e 500 µg (M2)

di DNA del plasmide pCVTat e della scimmia di controllo (M3) non

~~inoculata. L'attività antivirale sull'infezione acuta e cronica era eseguita~~

in cellule CEM x 174 infettate con il virus SHIV 89.6P e sulle cellule

OM-10-1 cronicamente infettate con HIV-1, come descritto nella

Tabella 7. I risultati sono espressi come percentuale (%) di inibizione

della replicazione virale nelle cellule trattate con i supernatanti dei

linfociti T CD8+ rispetto alle cellule non trattate. I risultati degli esperimenti di infezione acuta e cronica riportati nella tabella sono relativi ai campioni trattati con 5 μ l di supernatante dei linfociti CD8+. ND, non determinato.

I risultati in Tabella 24 dimostrano che la scimmia M1, inoculata con 200 mg di DNA per via intradermica, era positiva allo skin test alla 22^a settimana.

TABELLA 24
Skin test al Tat^a

Settimane dopo l'immunizzazione	Scimmie		
	M1	M2	M3
10	-	-	-
15	-	-	-
22	+	-	-
27	-	-	-
32	-	-	-
37	-	-	-
42	-	-	-
48	-	-	-
52	-	-	-
58	-	-	-

^aTat (1 e 5 mg) in 150 ml di PBS-0.1% BSA od il suo tampone venivano inoculati per via intradermica in un'area tricotomizzata del dorso degli animali vaccinati e nella scimmia di controllo (controllo di specificità della risposta) alla 10^a, 15^a, 22^a, 27^a, 32^a, 37^a, 42^a, 48^a, 52^a e 58^a settimana dopo il primo inoculo vaccinale. La scimmia M1 era inoculata con 200 mg di DNA del plasmide pCVTat per via intradermica, la scimmia M2 con 500 mg di DNA di pCVTat per via intramuscolare. La

N 02.03.99

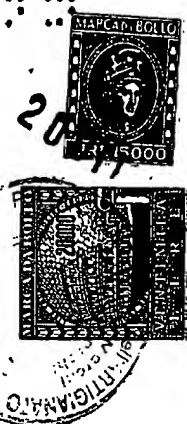
scimmia M3 (controllo) non era inoculata. La comparsa di un nodulo eritematoso dopo 48 - 72 ore indicava la presenza di ipersensibilità di tipo ritardato (DTH): ++, $\varnothing \geq 5$ mm; + $\varnothing \geq 1-4$ mm; +/-, eritema senza indurimento; -, $\varnothing < 1$ mm.

Questi risultati indicano che il plasmide pCVTat era ben tollerato alle dosi inoculate sia per via intradermica che intramuscolare e non era tossico. Inoltre, questi risultati dimostrano che l'immunizzazione con il DNA pCVTat induce la comparsa di una risposta umorale (seppure più bassa rispetto a quella indotta dalla immunizzazione con la proteina Tat ricombinante), e cellulare specifica anti-Tat con effetti antivirali.

Per quanto riguarda l'efficacia protettiva in seguito a challenge, effettuato alla 65^a settimana dall'inizio della vaccinazione, i dati virologici (Tabella 25) di antigenemia, citoviremia e di copie di DNA provirale (DNA-PCR) indicano che la scimmia M2, immunizzata con Tat-DNA per via intramuscolo, risultava protetta dall'infezione con 10 MID₅₀ di SHIV89.6P, mentre la scimmia M1, immunizzata per via intradermica e con una quantità minore di DNA (200 mg), era infettata

suggerendo che, per quanto concerne l'immunizzazione con DNA, la vaccinazione per via intramuscolo è più efficace di quella intradermica. La scimmia di controllo M3 risultava resistente all'infezione. Tuttavia, come descritto in precedenza, questa scimmia, diversamente dai

H 02.03.99



controlli degli altri protocolli, era stata ripetutamente sottoposta a skin test per il Tat al fine di controllare la specificità del test (Tabella 24) ed era risultata, sebbene a basso titolo (1:100), ripetutamente positiva per anticorpi anti-Tat a partire dalla 32^a settimana dall'inizio della vaccinazione (dati non mostrati). Infine, la risposta proliferativa al Tat evidenziava una debole e sporadica reattività all'antigene (Tabella 20). Benché non conclusivi, questi dati indicano che la ripetuta inoculazione per via intradermica di 5 o 6 mg di Tat possa aver indotto l'immunizzazione dell'animale e la protezione al challenge. Di conseguenza, la scimmia M3 verrà considerata vaccinata e studiata come tale.

TABELLA 25

Analisi dei parametri virologici

N° scimmia	Giorni dopo il challenge con il virus SHIV 89.P											
	15				30				60			
	p27 ^a (pg/ml)	DNA PCR (copie/ μg) ^b	Cito- viremia ^c	IgG anti- SIV ^d	p27 (pg/ml)	DNA PCR (copie/ μg)	Cito- viremi a	IgG Anti-SIV ^d	p27 (pg/ ml)	DNA PCR (copie / μg)	Cito- viremi a	IgG anti- SIV ^d
M1	1796	1278	>2818,3	1:10	68.6	1048	353,9	1:50	<20	8	21.3	1:800
M2	<20	<1	Neg	1:10	<20	<1	Neg	1:50	<20	<1	Neg	1:10
M3	<20	<1	Neg	>1:50	<20	<1	Neg	>1:50	<20	<1	Neg	1:100

La scimmia M1 era stata immunizzata con 200 mg di DNA del plasmide pCVTat per via intradermica, la scimmia M2 con 500 mg di DNA di pCVTat per via intramuscolare. La scimmia M3 (controllo) non era stata vaccinata. I parametri virologici sono stati valutati come riportato nella legenda della Tabella 17.

La determinazione al FACS della percentuale e del numero assoluto dei linfociti CD4 e CD8 confermava il dato virologico, con una netta diminuzione (di circa 4 volte) dei linfociti CD4+ nella scimmia infetta già al primo controllo (giorno 30 dopo il challenge) e che si confermava alla determinazione successiva (giorno 60) (Tabella 26).

TABELLA 26

Analisi al FACS delle popolazioni linfocitarie CD4+ e CD8+

N° scimmia	Giorni dopo il challenge con SHIV 89.6P											
	0			15			30			60		
	%			%			%			%		
	(cellule/ μ l)			(cellule/ μ l)			(cellule/ μ l)			(cellule/ μ l)		
	CD4+	CD8+	CD4+ / CD8+	CD4+	CD8+	CD4+ / CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/ CD8+	CD4+	CD8+	CD4+ / CD8+
M1	27,5 (940)	40,7 (1390)	0,68	ND	ND	ND	8,1 (250)	56,5 (1780)	0,14	9,5 (360)	69,7 (2650)	0,14
M2	22,2 (490)	36,8 (810)	0,6	ND	ND	ND	16,4 (580)	42,4 (1500)	0,39	10,9 (940)	52,7 (4560)	0,21
M3	28,7 (1170)	41,1 (1680)	0,7	ND	ND	ND	19,5 (970)	48,7 (2430)	0,4	17,9 (900)	52,2 (2620)	0,34

L'analisi era eseguita come riportato nella legenda della tabella 18. La scimmia M1 era stata immunizzata con 200 mg di DNA del plasmide pCVTat per via intradermica, la scimmia M2 con 500 mg di DNA di pCVTat per via intramuscolare. La scimmia M3 (controllo) non era stata vaccinata.

Sulle base di questi risultati è stato disegnato il secondo esperimento in cui è stato valutato l'effetto dell'immunizzazione con il DNA del plasmide pCVTat in tre scimmie (M9-11), rispetto ad una scimmia di controllo (M12) che riceveva il DNA del plasmide pCV0. Le scimmie sono state inoculate per via intramuscolare con 1 mg di pCVTat (M9-11) o di pCV0 (M12), in 2 siti nel dorso. Ai giorni 1-5, precedenti la vaccinazione, 250 µl di soluzione fisiologica contenente lo 0.5% di bupivacaina e lo 0.1% di metilparabene venivano inoculati nei due siti, opportunamente marcati, in cui successivamente veniva eseguita l'inoculazione del plasmide. Le scimmie erano vaccinate al tempo 0 e dopo 6, 11, 15, 21, 28 e 32 settimane. Infine alla 36^a settimana veniva eseguito un richiamo con la proteina Tat ricombinante (15 mg) risospesa in 200 µl di Iscom e 300 µl di PBS. Gli animali erano

osservati giornalmente per quello che riguarda i parametri clinici come descritto nell'Esempio 4. Inoltre si prelevavano campioni di 10 ml di sangue al giorno -9 prima dell'inizio della immunizzazione e negli stessi giorni della inoculazione come descritto nell'esempio 4. Al fine di

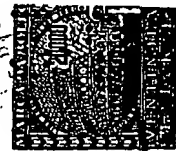
valutare l'effetto protettivo della vaccinazione, è stato effettuato il challenge delle scimmie alla 50^a settimana dall'inizio della immunizzazione, inoculando per via endovenosa 10 MID₅₀ di SHIV 89.6P. Il monitoraggio post-challenge è attualmente in corso ed è, effettuato come descritto nell'Esempio 4.

I risultati di questo esperimento sono i seguenti. Nelle scimmie vaccinate e nel controllo non si erano osservate alterazioni significative dei parametri clinici, ematochimici e comportamentali. Non si rilevavano segni di infiammazione o neoformazioni vascolari nei siti di inoculazione. Questi risultati confermano che il DNA del plasmide pCVTat era ben tollerato dagli animali e non era tossico alla dose di 1 mg somministrata per via intramuscolare. Anticorpi IgG specifici anti-Tat erano evidenziati dalla 15^a settimana (figura 13), con titoli compresi tra 1:50 e 1:100 (dati non mostrati). Era inoltre evidente una risposta proliferativa al Tat in una scimmia (M11) già dopo 2 settimane (Tabella 27).

TABELLA 27
Risposta proliferativa al
Tat^a

N°Sci mmia	Stimolo	Settimane dall'inizio dell'immunizzazione										
		2	6	11	15	21	28	32	36	40	44	50
M9	PHA	8,9	9,2	17,1	58,2	18	47,1	43,4	3,1	72,6	64,6	7
	TT	2,9	1,7	0,9	1	1,8	0,7	1,1	0,8	1	7	2,7
	Tat	0,4	0,5	0,6	1,5	1,6	0,9	1	0,7	1,1	7	1,9
M10	PHA	8,5	18	19,8	ND	10,1	2,2	14,7	15,2	4,4	8,4	ND
	TT	2,4	0,3	0,8	ND	1,1	0,6	1	0,9	0,6	6,4	ND
	Tat	1	0,3	0,7	ND	1,1	0,5	1	0,9	0,7	4,2	ND

H O O



M11	PHA	25,7	43,3	81,7	12,1	27,8	3,4	21,3	14,1	15,9	25,8	ND
	TT	4,2	1,9	1,3	0,9	1,1	3,6	1,2	0,8	0,3	1,8	ND
	Tat	5,1	0,9	1,6	0,7	1,1	1,1	1,2	0,7	0,7	3	ND
M12	PHA	28,7	30,9	41	50,7	30,8	7,6	43	22,6	34,6	19,9	55,1
	TT	3,2	1,6	0,9	5,2	1,6	1,6	1,3	1,1	1	0,7	3,1
	Tat	3,2	1,4	0,8	1,3	1	1,6	1	0,8	1	1,6	1,3

^aLinfociti di sangue periferico venivano isolati, stimolati con PHA (4 mg/ml), il tossoide tetanico (TT) (10 mg/ml) e Tat (1 o 5 mg/ml) e saggiati come descritto in Tabella 5. Le scimmie (M9-11) erano inoculate per via intramuscolare con 1 mg di DNA del plasmide pCVTat e la scimmia di controllo (M12) era inoculata con 1 mg di DNA del plasmide pCV0. ND, non determinato.

La presenza di CTL anti-Tat è stata osservata nella scimmia M11 alla 32^a settimana post-immunizzazione (Tabella 28).

TABELLA 28
Analisi dell'attività citotossica specifica per Tat (CTL)^a

N° Scimmia	Settimana	Rapporto bersaglio/effettore						Attività CTL
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Media	
M9	32	0	0	0	0	0	0	-
	50	4,2	0	0	0	0,9	1	-
M10	32	0	0	9,9	2,7	0	2,5	-
	50	3,5	0	2,3	0	0	1,1	-
M11	32	0	10,5	8,9	3,5	0,9	4,7	+
	50	0	0	0	3,8	0,3	0,8	-
M12	32	0	0	0	0	0	0	-
	50	0	0	0	0	0	0	-

^aIl saggio era eseguito come descritto nella Tabella 6. Le scimmie (M9-11) erano inoculate per via intramuscolare con 1 mg di DNA del plasmide pCVTat e la scimmia di controllo (M12) era inoculata con 1 mg di DNA del plasmide pCV0.

PBMC ottenuti alla 44^a settimana dalla stessa scimmia M11 risultavano resistenti all'infezione, in vitro, con diluizioni seriali del virus chimerico SHIV 89.6P in un test (TAA) che rileva la presenza di attività antivirale totale. La TAA infatti e' valutata come la capacità dei PBMC delle scimmie vaccinate con il DNA del plasmide pCVTat, coltivati in presenza di siero autologo, di resistere all'infezione con dosi scalari del virus (Tabella 29).

TABELLA 29

Analisi della presenza di attività antivirale totale (TAA)^a

N° scimmia	Giorni dopo l'infezione	
	7	17
	Dose minima infettante (TCID ₅₀ /cellula)	Dose minima infettante (TCID ₅₀ /cellula)
M9	10 ⁻²	>10 ⁻² **
M10	10 ⁻³	10 ⁻²
M11	>10 ⁻² *	>10 ⁻² *
M12	10 ⁻²	>10 ⁻² **

^aIl saggio era eseguito come descritto nella Tabella 13. Le scimmie erano inoculate con 1 mg di DNA del plasmide pCVTat per via intramuscolare (M9-11) e la scimmia di controllo (M12) con 1 mg del plasmide pCV0. I PBMC erano prelevati alla settimana 44 dall'inizio della vaccinazione ed infettati in vitro con 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ TCID50 di

SHIV 89.6P. I risultati sono espressi come la dose minima di SHIV (TCID₅₀/cellula) con la quale le cellule sono risultate infettabili.

*Nessuna coltura è risultata infettata alla concentrazione più alta di SHIV utilizzata nel saggio, corrispondente a 10² TCID₅₀/cellula. ** Le colture si negativizzavano in diciassettesima giornata.

I risultati in Tabella 30 dimostrano la presenza di attività antivirale solubile (CAF) mediata dai linfociti T CD8+ nelle scimmie vaccinate che, in questo protocollo risulta aumentata anche nella scimmia di controllo inoculata con il vettore vuoto (PCV-0).

TABELLA 30

Analisi della presenza di attività antivirale solubile mediata dalle cellule T CD8+ (CAF)^a

N° scimmia	Settimane dall'inizio della vaccinazione	% di inibizione della replicazione virale	
		Infezione acuta	Infezione cronica
M9	0	21	14,6
	36	77	2,6
M10	0	40	13,8
	36	67	25
M11	0	49	19
	36	42	14
M12	0	65	23
	36	62	14

^aAnalisi della presenza di attività antivirale solubile prodotta dalle cellule

T CD8+ (CAF). I PBMC erano prelevati da 3 scimmie (M9-11) inoculate con 1 mg di DNA del plasmide pCV-Tat e dalla scimmia di controllo (M12) inoculata con 1 mg di DNA del plasmide pCV0. Il saggio relativo all'infezione acuta era eseguito in cellule CEM x 174 infettate con il virus

H 02.03.99

SHIV, come descritto nella Tabella 7. Il saggio relativo all'infezione cronica era eseguito in cellule U1 cronicamente infettate con HIV-1, come descritto nella Tabella 14. I risultati sono espressi come percentuale (%) di inibizione della replicazione virale nelle cellule trattate con 5 μ l dei supernatanti dei linfociti T CD8+ rispetto alle cellule nontrattate.

La produzione di citochine (γ IFN, IL-4, TNF α) e della chemochina Rantes era valutata alla 44^a settimana dai PBMC delle scimmie vaccinate con il DNA del plasmide pCVTat e dal controllo (Tabella 31).

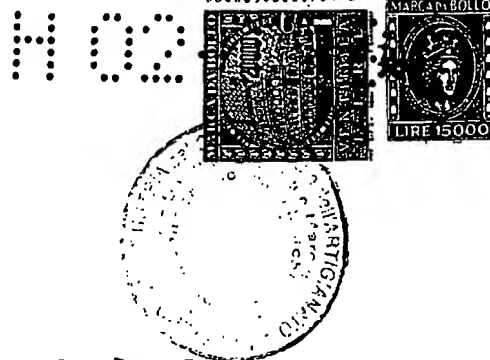
TABELLA 31

Analisi della produzione di citochine e chemochine*

N° scimmia	Controllo				PHA				TT			
	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes
M9	-/-	-/3,5	-/-	-/-	312/204	-/-	250/-	536/2288	-/-	-/-	-/-	nd/nd
M10	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd
M11	-/-	-/-	-/-	-/-	420/183	-/-	388/-	4336/3124	-/-	-/-	-/-	nd/nd
M12	-/-	-/3,2	-/-	-/-	430/832	-/-	-/-	1936/2576	-/-	-/-	218/nd	nd/nd

N° scimmia	Tat (1 µg)				Tat (5 µg)			
	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes	γIFN	IL-4	TNFα	Rantes
M9	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
M10	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd	nd/nd
M11	-/-	-/-	-/-	544/368	-/-	-/3,5	-/-	2124/-
M12	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

*Il saggio era eseguito come descritto nella Tabella 15. Le scimmie erano vaccinate per via intramuscolare con 1 mg di DNA del Smide pCVTat (M9-11) e la scimmia di controllo era inoculata con il DNA del plasmide pCV0. I PBMC erano prelevati alla settimana 44 dall'inizio della vaccinazione. I risultati sono riportati come valori (pg/ml) delle citochine o di Rantes a 48 e 96 ore (48/96) rispettivamente. (-), i valori erano inferiori ai valori di cut off. I valori di cut off (pg/ml) erano: γIFN, 31.2; IL-4, 3.12; TNFα, 15.6; Rantes, 62.5. nd, non determinato.



H 02.03.99

I risultati dimostrano la presenza di una debole reazione allo skin test

in una scimmia (M9) alla 11^a settimana (Tabella 32).

TABELLA 32
Skin test al Tat^a

N° scimmia	Settimane dall'inizio dell'immunizzazione						
	11	15	21	28	32	36	44
M9	+/-	-	-	-	-	-	-
M10	-	-	-	-	-	-	-
M11	-	-	-	-	-	-	-
M12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aTat (1 e 5 mg) in 150 ml di PBS-0.1% BSA od il suo tampone venivano

inoculati per via intradermica in un'area tricotomizzata del dorso degli

animali vaccinati ma non nei controlli (ND, non determinato) all'11^a,

15^a, 21^a, 28^a, 32^a, 36^a e 44^a settimana dopo il primo inoculo vaccinale.

Le scimmie (M9-11) erano state vaccinate per via intramuscolare con 1

mg di DNA del plasmide pCVTat e la scimmia di controllo (M12) era

inoculata con 1 mg di DNA del plasmide pCV0. La comparsa di un

nodulo eritematoso dopo 48 - 72 ore indicava la presenza di

ipersensibilit  di tipo ritardato (DTH): ++, $\varnothing \geq 5$ mm; + $\varnothing \geq 1-4$ mm; +/-,

eritema senza indurimento; -, $\varnothing < 1$ mm.

I risultati post-challenge indicano che tutti gli animali vaccinati erano

protetti dall'infezione con 10 MID₅₀ di SHIV89.6P, come indicato dai

tests virologici (antigenemia plasmatica, determinazione delle copie di

DNA provirale, citoviremia) risultati tutti negativi (Tabella 33). Inoltre la

presenza di anticorpi anti-SIV nella scimmia M11 indicavano l'avvenuta esposizione al virus o un'infezione abortiva al virus inoculato. Al contrario, nelle altre scimmie non ci sono ancora titoli anticorpali rilevabili e si procederà alla determinazione degli anticorpi prodotti in vitro, ed eventualmente, alla determinazione della risposta proliferativa linfocitaria ad antigeni di SIV. Qualora l'esito di questi esami fosse negativo, le scimmie saranno inoculate con una dose maggiore del virus in quanto anche la scimmia di controllo M12 è risultata resistente all'infezione. Questa scimmia era stata vaccinata con il vettore pCV0 vuoto. Dati recenti in letteratura hanno dimostrato il ruolo adiuvante svolto da certe sequenze di DNA che sono assai più frequenti nei batteri che nelle cellule eucariotiche e che, alla pari del lipopolisaccaride e del mannosio, costituiscono un forte stimolo per l'immunità naturale [Roman et al., Nature Med 3:849 (1997)]. Pertanto, esiste la possibilità che la protezione osservata nella scimmia M12 sia da mettere in relazione ad una generica attività antivirale indotta da tali sequenze batteriche in grado di indurre produzione di IFN α , IFN β , IL-12 ed IL-18, con funzioni immunomodulatorie ed antivirali. Ciò è avvalorato dalla presenza in questa scimmia di attività antivirale TAA (Tabella 29) e CAF (Tabella 30) in assenza di immunità umorale o cellulare specifica per Tat. Infatti questi saggi misurano anche attività

H 02.03.99

antivirali non antigene specifiche. Ciò e' confermato dall'infezione della scimmia M13 inoculata con una dose di virus 3.5 volte inferiore a quella utilizzata per il challenge della scimmia M12 (Tabella 33). Sulla base di questo risultato l'inventore si propone di utilizzare come adiuvante il vettore pCV0, o parti di esso.

TABELLA 33

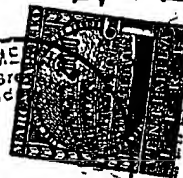
Analisi dei parametri virologici

N° scimmia	Giorni dopo il challenge con il virus SHIV 89.P											
	15				30				60			
	p27 ^a (pg/ml)	DNA PCR (copie/ µg) ^b	Cito- viremi a ^c	IgG Anti- SIV ^d	p27 (pg/ml)	DNA PCR (copie/ µg)	citov iremi a	IgG Anti- SIV ^d	p27 (pg/ml)	DNA PCR (copie/ µg)	citovir emia	IgG Anti- SIV ^d
M9	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg
M10	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg
M11	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	Neg
M12	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg
M13	1876	+f	+e	ND	<20	+f	ND	1:1600	<20	43	ND	1:3200

I saggi erano eseguiti come descritto nella legenda della tabella 17. Le scimmie (M9-11) erano state vaccinate per via intramuscolare con 1 mg di DNA del plasmide pCVTat e la scimmia di controllo (M12) era stata inoculata con 1 mg di DNA del plasmide pCV0. La scimmia M13 era un animale naive infettato con 2.85 MID₅₀ di SHIV89.6P.

La determinazione al FACS della percentuale e del numero assoluto dei linfociti CD4 e CD8 (Tabella 34) confermava il dato virologico. Infatti un significativo decremento del numero dei CD4 si osservava al

H 02.03.99



giorno 15 e 60 post-challenge solo nella scimmia di controllo M13 risultata infetta in base alla positività dei tests di antigenemia plasmatica, di rilevamento di DNA provirale, e di isolamento virale (Tabella 33).

TABELLA 34

Analisi al FACS dei linfociti CD4+ e CD8+

N° scimmia	Giorni dopo il challenge con SHIV 89.6P											
	0			15			30			60		
	%			%			%			%		
	(cellule/μl)			(cellule/μl)			(cellule/μl)			(cellule/μl)		
	CD4+	CD8+	CD4+ / CD8+	CD4+	CD8+	CD4+ / CD8+	CD4+	CD8+	CD4+ / CD8+	CD4+	CD8+	CD4+ / CD8+
M9	21,5 (1500)	37,6 (2630)	0,57	ND	ND	ND	26,4 (1340)	51,6 (2610)	0,51	30,6 (2000)	45,5 (2980)	0,67
M10	39,5 (1050)	36,3 (960)	1,1	ND	ND	ND	34,8 (1730)	41,8 (2080)	0,83	31,6 (3760)	52,2 (6200)	0,61
M11	35,8 (1080)	37,7 (1140)	0,95	ND	ND	ND	28,7 (1330)	36,7 (1710)	0,78	24,5 (890)	48,7 (1770)	0,5
M12	30,9 (1860)	46 (2760)	0,67	ND	ND	ND	26,7 (1300)	49,6 (2420)	0,54	23,7 (2620)	52,1 (5760)	0,45
M13	40,5 (2590)	39,7 (2544)	1,01	38,4 (434)	33,6 (380)	1,14	35,1 (1721)	32,2 (1479)	1,16	3,1 (111)	62,3 (2225)	0,05

L'analisi era eseguita come descritto nella legenda della tabella 18. Le

scimmie (M9-11) erano state vaccinate per via intramuscolare con 1 mg

di DNA del plasmide pCVTat e la scimmia di controllo (M12) era

inoculata con 1 mg di DNA del plasmide pCV0. La scimmia M13 era un

animale naive infettato con 2.85 MID₅₀ di SHIV89.6P.

Questi risultati dimostrano che la vaccinazione con il DNA del plasmide pCVTat era ben tollerata dagli animali e non era tossica, confermando i risultati relativi alla sicurezza e tollerabilità della vaccinazione a DNA ottenuti nel primo esperimento pilota. Questi dati confermano l'osservazione riportata nel primo esperimento, e forniscono ulteriori evidenze che il DNA del plasmide pCVTat induce una risposta umorale (seppure più modesta rispetto a quella indotta dall'immunizzazione con la proteina Tat) e cellulare specifica anti-Tat con effetti antivirali, parte dei quali potrebbero essere dovuti a sequenze specifiche presenti nel vettore pCV0 che potrebbero fungere da adiuvanti vaccinali.

Saranno valutati anche protocolli di immunizzazione in cui saranno inclusi combinazioni dei DNA esprimenti gli altri geni di HIV-1 e/o citochine, descritti nell'esempio 3. In questi esperimenti si utilizzeranno per il challenge virus SHIV contenenti i geni tat, rev e nef di HIV [Shibata et al., J. Virol. 65:314 (1991); Li et al., J. AIDS 5:639 (1992); Sakuragi et al., J. Gen. Virol. 73:2983 (1992); Li et al., J. AIDS 5:639 (1992); Igarashi et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 10:1021 (1994); Luciw et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92:7490 (1995); Reinmann et al., J. Virol. 31: 98 (1996)].

I DNA dei plasmidi pCV0 e pCVTat saranno inoculati negli animali utilizzando altri sistemi di "delivery" che potrebbero rendere più efficace l'immunizzazione, quali l'uso di liposomi, nanoparticelle, eritrociti, "gene gun" o tramite l'utilizzo di vettori erpetici come descritto nell'Esempio profetico 9 e 10.

Esempio 6. Vaccinazione terapeutica

Al fine di valutare gli aspetti di sicurezza e di tossicità del vaccino anti-Tat in soggetti già infetti e' stato disegnato un protocollo di vaccinazione terapeutica anti-Tat, sia proteica che a DNA, in scimmie infettate con dosi scalari di SHIV 89.6P e con immunodeficienza (AIDS). Lo stock virale utilizzato per l'infezione era ottenuto dalla milza e dai linfonodi di una scimmia cynomolgus infettata 14 giorni prima. I linfociti, purificati dai tessuti mediante disaggregazione meccanica, venivano suddivisi in due aliquote alla concentrazione di $1.5 \times$

10^6 cellule/ml. Una aliquota era depletata dei linfociti T CD8+ mediante l'uso di biglie paramagnetiche (Dynal, Norvegia). Entrambe le colture erano stimulate con PHA ($1 \mu\text{g/ml}$) per tre giorni e quindi seminate alla concentrazione di 1×10^6 cellule/ml in presenza di IL-2 (50 U/ml). La

presenza di virus nel supernatante era determinata mediante la ricerca della trascrittasi inversa (RT) nel terreno di coltura, prelevato ad intervalli di tre giorni, utilizzando 1 ml del supernatante delle colture

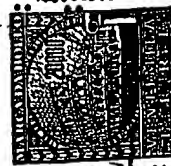
H 02.03.99

cellulari, chiarificato e ultracentrifugato per 11 min. a 100.000 rpm a + 4° C (ultracentrifuga Beckman TL-100). Il pellet ottenuto era lisato e 30µl erano addizionati alla miscela di reazione (TRIS HCl 1M, pH 8; MgCl₂, 0.5 M; KCl 1M; Poly A 1mg/ml; oligo-dT 12-18 100 µg/ml; DTT 0.02 M; 1,2 ³H-Metil timidina trifosfato 1mCi/ml) ed incubati a 37° C per 60'. La reazione era terminata con 500 µl di Na Pirofosfato 0.1 M pH 5 e 600 µl di acido tricloroacetico (TCA) 20% ed il campione era raccolto su filtro da 0.45 µm (Millipore) e letto al β-counter dopo aggiunta di 5 ml di liquido di scintillazione (Filter Count, Packard).

I terreni che contenevano valori di RT maggiori a 20.000 cpm erano centrifugati e addizionati del 10% di siero umano di gruppo AB. Il virus era concentrato mediante centrifugazione a 30.000 rpm (90' a 4° C), risospeso in RPMI 1640 contenente il 10% di siero umano (gruppo AB), aliquotato e conservato in azoto liquido. Lo stock virale era titolato in vitro nelle linee umane CEM x 174 e C8166 (3 x 10³ TCID₅₀/cellula), e in vivo nelle scimmie cynomolgus (3.17 x 10^{5.69} MID₅₀/ml).

E' stato iniziato un primo esperimento pilota in cui 7 scimmie sono state infettate per via endovenosa con lo SHIV89.6P preparato come appena descritto. Ciascuna scimmia riceveva 1 ml di SHIV diluito in soluzione fisiologica contenente il 2% di siero umano (gruppo AB, Rh -)

H 02.03.99



secondo il seguente schema. Una scimmia (IM1) era inoculata con la diluizione 1:500; due scimmie (IM2, IM3) ricevevano la diluizione 1:5.000; due scimmie (IM4, IM5) erano inoculate con la diluizione 1: 50.000; una scimmia (IM6) era inoculata con la diluizione 1: 500.000; una scimmia (IM7) era inoculata con la diluizione 1: 5.000.000. Da tutte le scimmie erano prelevati 10 ml di sangue al giorno -7 antecedente l'infezione con lo SHIV per la determinazione dei parametri di base. Campioni di siero e di plasma erano congelati a -20° C o -80° C ed utilizzati successivamente per risospendere l'inoculo proteico. Al tempo 0 tutte le scimmie erano inoculate con lo SHIV89.6P. Le scimmie erano controllate giornalmente. Inoltre, al tempo 0 e alle settimane 2 e 4 dopo l'infezione erano prelevati 10 ml di sangue per eseguire gli esami di laboratorio (analisi chimico-cliniche, elettroliti, conta dei leucociti, delle piastrine, dell'emoglobina) e l'analisi dei parametri immunologici e virologici, quali la determinazione dei valori plasmatici di p27 ed il carico virale nel plasma e nelle cellule. Alla 4^a settimana dopo l'infezione, 6 scimmie (IM1-6) risultavano infettate. La scimmia IM7 che aveva ricevuto la diluizione 1: 5.000.000 di SHIV non risultava infettata

(Tabella 35).

TABELLA 35

Analisi della presenza di SHIV 89.6P in scimmie infettate con diverse diluizioni del virus

N° scimmia	Diluizione SHIV 89.6P	Settimane dopo l'infezione					
		0		2		4	
		Isolamento virale ^a	p27 (pg/ml) ^b	Isolament o virale ^a	p27 (pg/ml)	Isolamento virale ^a	p27 (pg/ml)
IM1	1:500	ND	ND	+	>450	+	47
IM2	1:5.000	ND	ND	+	>450	+	161,8
IM3	1:5.000	ND	ND	+	>450	+	6,67
IM4	1:50.000	ND	ND	+	<20	+	>450
IM5	1:50.000	ND	ND	+	>450	+	166,7
IM6	1:500.000	ND	ND	+	>450	+	0
IM7	1:5.000.000	ND	ND	-	0	-	0

^aL'isolamento del virus e ^bla p27 plasmatica (pg/ml) erano effettuati come descritto nella legenda della tabella 17. Le scimmie erano inoculate con diluizioni crescenti dello stock virale per via endovenosa come descritto nel testo.

Dopo 7 settimane dall'infezione gli animali infettati che già mostravano gravi segni di immunodeficienza erano vaccinati con la proteina Tat e il

DNA del plasmide pCVTat secondo il seguente schema. Le scimmie IM1, IM3, IM5 e IM6 ricevevano la proteina Tat (20 µg), risospesa in 250 µl di PBS-A contenente lo 0.1% di BSA e il 20% di plasma autologo e 250 µl di adiuvante Alum, per via sottocutanea in un sito nel

dorso, e il DNA del plasmide pCVTat (1 mg), risospeso in 1 ml di PBS-A, per via intramuscolare in un sito, distinto dal precedente, nel dorso.

Le scimmie IM2 e IM4 (controllo) erano inoculate con 250 µl di Alum e

250 µl di PBS-A, contenente lo 0.1% di BSA e il 20% di plasma autologo, per via sottocutanea in un sito del dorso, e con il DNA del plasmide pCV0 (1 mg), risospeso in 1 ml di PBS-A, per via intramuscolare in un sito del dorso, distinto dal precedente. La scimmia IM7, non essendo stata infettata, non era sottoposta a vaccinazione. Le scimmie erano vaccinate al tempo 0 (corrispondente alla 7^a settimana dopo l'infezione con SHIV) e dopo 1, 4, 5, 10, 11, 13, 14, 17 e 18 settimane. Per valutare gli effetti della vaccinazione sulla progressione della malattia, ciascun animale era osservato giornalmente per la comparsa di segni apparenti di malattia, e inoltre da ogni scimmia erano prelevati 10 ml di sangue al tempo 0 e alla settimana 3, 8, 12, 16 e 21 dall'inizio della vaccinazione, per eseguire gli esami di laboratorio (analisi chimico-cliniche, elettroliti, conta dei leucociti, delle piastrine, dell'emoglobina), per la valutazione dei parametri immunologici, quali la presenza di immunoglobuline specifiche, i livelli di citochine del tipo Th1 e Th2, la produzione di chemochine, per la caratterizzazione del fenotipo linfocitario (CD4, CD8, CD28, CD40, CD86, CD20, CD2, CD26, CD20), e per l'analisi dei parametri virologici, quali la presenza di DNA virale nelle cellule con PCR semiquantitativa, la viremia plasmatica con RT-PCR competitiva, l'antigenemia plasmatica (p27 Gag) mediante saggi ELISA e la presenza di anticorpi contro gli

antigeni di SHIV come descritto negli esempi precedenti. La somministrazione di altri richiami sarà stabilita sulla base dei risultati clinici, virologici ed immunologici. Dopo l'ultima inoculazione il monitoraggio avverrà con frequenza mensile ed ogni qualvolta siano apparsi segni indicanti un repentino cambiamento del quadro clinico. Campioni di PBMC, siero, plasma ed urine verranno congelati ad ogni controllo per successive valutazioni come descritto in precedenza.

I risultati attualmente disponibili di questo esperimento, relativi alla 8^a settimana dall'inizio dell'immunizzazione, sono i seguenti. Nelle scimmie vaccinate e nei controlli non erano osservati segni di infiammazione e neoformazioni vascolari nei siti di inoculazione, ne' di sintomi generali nelle scimmie asintomatiche o di modificazioni della sintomatologia in animali già sintomatici. Inoltre, non si sono osservati effetti transattivanti la replicazione virale. Infatti, i dati ottenuti indicano

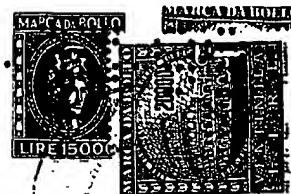
la mancanza sia di effetti tossici sia di aumento della replicazione virale negli animali vaccinati (Tabella 36).

TABELLA 36

Analisi dei parametri virologici

N° scimmia	Settimane dall'inizio della vaccinazione					
	0		3		8	
	p27 (pg/ml)	DNA PCR N° copie/μg	p27 (pg/ml)	DNA PCR N° copie/μg	p27 (pg/ml)	DNA PCR N° copie/μg
IM1	12,3	68	17,3	52	141	41

H O



IM3	0	61	0	48	0	71
IM5	97,1	20	21,7	15	23,6	95
IM6	0	43	0	55	0	24
IM2	21,2	ND	36,6	53	27,4	78
IM4	81	195	22	288	15,4	135
IM7	ND	ND	ND	ND	0	>1

I saggi sono stati determinati come descritto nella Tabella 17. Le scimmie IM1, IM3, IM5 e IM6 erano inoculate con la proteina Tat (20 μ g) e Alum per via sottocutanea e con il PCVTat (1mg) per via intramuscolare. Le scimmie IM2 e IM4 (controlli) erano inoculate con Alum per via sottocutanea e con il PCV0 (1 mg) per via intramuscolare. IM7 era una scimmia di controllo non infettata e non vaccinata.

L'analisi al FACS indicava che il numero dei linfociti CD4+ e CD8+ non variava significativamente dopo vaccinazione (Tabella 37).

TABELLA 37

Analisi al FACS del numero dei linfociti CD4+ e CD8+

N° Scimmi a	Tempo 0			Settimane dall'inizio della vaccinazione								
				0			3			8		
	%			%			%			%		
	(cellule/ μ l)			(cellule/ μ l)			(cellule/ μ l)			(cellule/ μ l)		
	CD4+	CD8+	CD4/CD8	CD4+	CD8+	CD4/CD8	CD4	CD8	CD4/CD8	CD4	CD8	CD4/CD8
IM1	25,39 (1264)	36,8 (1831)	0,69	3,3 (101)	64,16 (1963)	0,05	2,32 (52)	63,34 (1431)	0,04	3,41 (96)	55,41 (1559)	0,06
IM3	19,26 (869)	26,45 (1193)	0,73	2,84 (74)	58,22 (1526)	0,05	3,21 (92)	58,16 (1663)	0,05	3,18 (91)	50,12 (1434)	0,06
IM5	24,75	58,04	0,42	2,28	57,3	0,04	2,89	55,6	0,05	2,15	54,3	0,04

	(580)	(1361)		(38)	(946)		(48)	(917)		(60)	(1527)	
))))	
IM6	40,46 (2590)	39,74 (2544)	1,01	3,12 (111)	62,3 (2225)	0,05	2,75 (138)	65,40 (3290)	0,04	2,3 (73)	52,18 (1659)	0,04
)))))	
IM2	42 (1787)	34,7 (1476)	1,21	2,41 (68)	58,12 (1632)	0,03	2,7 (121)	57,6 (2580)	0,05	1,89 (66)	50,6 (1763)	0,04
)))))	
IM4	30,72 (1589)	27,76 (1680)	1,10	2,12 (113)	61,13 (3248)	0,03	1,92 (90)	60,3 (2828)	0,03	3,12 (164)	53,12 (2790)	0,06
)))))	
IM7	17,02 (871)	55,8 (2857)	0,30	ND	ND	ND	20,26 (770)	51,40 (1957)	0,39	24,1 (868)	50,43 (1842)	0,48
))))	

L'analisi era eseguita come descritto nella legenda della Tabella 18. Le scimmie IM1, IM3, IM5 e IM6 erano inoculate con la proteina Tat (20 µg) e Alum per via sottocutanea e con il PCVTat (1mg) per via intramuscolare. Le scimmie IM2 e IM4 (controlli) erano inoculate con Alum per via sottocutanea e con il PCV0 (1 mg) per via intramuscolare. IM7 era una scimmia di controllo non infettata e non vaccinata.

Cio' conferma che la proteina Tat e il DNA del plasmide pCVTat erano ben tollerati dagli animali infettati e non erano tossici alle dosi somministrate e per le vie di inoculazione utilizzate e non aumentano la replicazione virale negli animali infettati.

Esempio 7.

La costimolazione con biglie anti-CD3/28 di linfociti CD4+ purificati da scimmie infette con SIV+ induce l'espansione

logaritmica del numero delle cellule in assenza di significativa
replicazione e propagazione del virus.

Le cellule del sangue periferico sono state deplete della sottopopolazione CD8+ mediante l'impiego di biglie paramagnetiche anti-CD8 (DynaI, Oslo; Dynabeads M-450 CD8) e la purezza delle popolazioni ottenute è stata valutata tramite l'analisi citofluorimetrica e considerata accettabile se maggiore del 95%. Le cellule CD8 deplete (denominate CD8-PBMC) sono state messe in coltura e stimulate con PHA (2µg/ml) e IL-2 (40 U/ml) o con biglie paramagnetiche previamente coniugate con due anticorpi monoclonali specifici per gli antigeni CD3 (Clone FN18, Biosource) e CD28 (Clone 9.3) (biglie anti-CD3/28). Allo scopo di facilitare il legame con le biglie anti-CD3/28 l'incubazione è avvenuta su un dispositivo rotante e le cellule coniugate, selezionate con l'ausilio di un magnete, sono state

denominate CD8-CD3+CD28+ e poste in coltura. La concentrazione delle cellule è stata riportata a quella di partenza 3 volte a settimana ed è stata aggiunta IL-2 ove indicato; inoltre per quanto riguarda le cellule stimulate con biglie anti-CD3/28, esperimenti preliminari hanno

dimostrato la convenienza dell'utilizzo di un regime di stimolazione continua ripristinando il rapporto ottimale biglie:cellule ad ogni conta eseguita. Nostri studi hanno infatti dimostrato che in assenza di IL-2

H 02.03.99

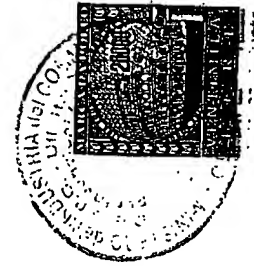
esogena la sottopopolazione CD8-CD3+CD28+ prolifera significativamente meglio delle cellule CD8-PBMC in risposta alla costimolazione con biglie anti-CD3/28 e che l'aggiunta di IL-2 (40 U/mL, 3 volte alla settimana) migliora significativamente la cinetica di proliferazione sia per durata che per numero di cellule ottenute (figura 14).

Allo scopo di valutare l'attività antivirale, cellule CD8-CD3+CD28+ purificate da 4 animali non infettati sono stati infettati al giorno 0 con 0.1 M.O.I. di SIV e mantenute in condizioni di stimolazione continua; come controllo sono stati impiegati CD8-PBMC stimolati con PHA e IL-2. L'andamento dell'infezione è stato monitorato mediante determinazione dell'antigene virale p27 Gag nei sovrinatanti delle colture utilizzando un kit ELISA commerciale (Coulter, Hialeah, FL). I livelli di p27 (ng/ml) misurati al giorno 6 e 12 dopo l'infezione e riportati

in figura 15 hanno indicato una netta differenza fra le due condizioni di stimolazione in termini di produttività dell'infezione. Infatti al giorno 6 la riduzione percentuale della p27 rispetto ai campioni stimolati con PHA e IL-2 era compresa fra il 40% e l'87% e al giorno 12 tale riduzione era

incrementata in 2 soggetti su 4 indicando una minore permissività delle cellule all'infezione virale. In un solo caso (MK 9401) abbiamo registrato la propagazione dell'infezione anche nella condizione di

H 02:03



stimolazione con biglie anti-CD3/28. I risultati descritti dimostrano che il *Macacus fascicularis* rappresenta un buon modello per la espansione ex vivo di sottopopolazioni linfocitarie in assenza di significativa replicazione virale mediante costimolazione con biglie anti-CD3/28 e costituisce il razionale per un vaccino terapeutico basato sulla espansione e reinfusione, in soggetti infetti con HIV, di linfociti autologhi specifici per gli antigeni virali proposti.

Esempio 8

Uso delle cellule dendritiche a scopi vaccinali

Le cellule dendritiche (DC) ed in minore misura i macrofagi sono in grado di presentare efficacemente gli Ag ai linfociti T ed indurre la proliferazione o l'acquisizione di specifiche attività citotossiche. Tali cellule sono dette pertanto "cellule presentanti l'Ag" (APCs) e sono in grado di iniziare la risposta immune. DC possono, quindi, essere utilizzate in protocolli di immunizzazione ex vivo. A tali scopi, i precursori delle DC erano isolati dal sangue periferico di *Macaca fascicularis* mediante coltura in vitro delle cellule aderenti con GM-CSF e IL-4 per 7 giorni, oppure mediante purificazione di cellule CD34⁺ con metodiche immunomagnetiche e successiva coltura in vitro con GM-CSF e TNF- α per 14 giorni. L'analisi morfologica e la caratterizzazione fenotipica (FACS analisi e immunoistochimica) erano condotte per

confermare l'identità delle cellule ottenute in coltura. L'analisi funzionale si basa sulla capacità delle DC di indurre la proliferazione di linfociti allogenici che è una caratteristica distintiva di queste cellule.

I dati finora ottenuti confermano la messa punto della purificazione e della caratterizzazione funzionale delle DC, mentre la fenotipizzazione delle cellule è parziale per la limitata cross-reattività degli anticorpi monoclonali diretti contro marcatori di lineaggio umani con quelli di scimmia. In particolare, per quanto concerne la metodica di isolamento dei precursori di DC, PBMC ottenuti dopo stratificazione su gradiente di Ficoll, venivano ulteriormente stratificati su gradiente discontinuo di Percoll (50% e 42,5 %). La frazione cellulare che, dopo centrifugazione a 500 g per 30', si poneva all'interfaccia fra i due gradienti era costituita prevalentemente da cellule di tipo monocitario (come confermato dall'analisi al FACS, risultati non mostrati) che, tenute a 4° C per evitarne l'aderenza alla plastica, venivano raccolte, lavate, contate e messe in coltura a 37° C. Il giorno successivo le cellule non aderenti erano rimosse mediante 4 lavaggi delicati. Alle cellule aderenti veniva aggiunto terreno completo addizionato di GM-CSF (200 ng/ml,

Leucomax, Sandoz, Milano, Italia) ed IL-4 (200 U/ml, Pepro Tech, London, England) per indurre la differenziazione in DC, o terreno completo in assenza di citochine per consentire il normale

differenziamento dei monociti in macrofagi. Ogni 3-4 giorni metà' del terreno veniva sostituito con terreno nuovo identico per composizione a quello utilizzato al giorno 0. La maturazione in DC della frazione cellulare trattata con citochine veniva verificata con l'acquisizione delle caratteristiche morfologiche tipiche delle DC quali la clusterizzazione, la perdita dell'aderenza, lo sviluppo di propaggini. Le cellule monocito-macrofagiche aderenti lasciate in coltura senza l'aggiunta di citochine venivano trattate con EDTA (0,5 mM in PBS senza calcio e magnesio) per staccarle dalla plastica, lavate due volte, contate e risospese in terreno e concentrazione ottimale a seconda del test da effettuare. Per gli esperimenti di coltura mista leucocitaria allogeneica (AMLR), le APCs ottenute (DC o Macrofagi) erano cimentate con numeri fissi di linfociti T allogenici purificati su gradiente di Ficoll, Percoll ed aderenza ed in seguito congelati. La AMLR veniva eseguita in piastre da 48 pozzetti con 0.5×10^6 linfociti T e APCs in numero variabile. Al quarto giorno di coltura aliquote fisse di sospensione cellulare venivano piastrate in triplicato per ciascuna condizione in piastre da 96 pozzetti; 1 μ Ci di timidina tritiata veniva aggiunta a ciascun pozzetto e la piastra lasciata incubare per 16 ore. Al termine dell'incubazione si procedeva alla valutazione della quantità di timidina incorporata [conte per minuto (cpm)] dalle cellule tramite lettura ad un contatore a scintillazione. I

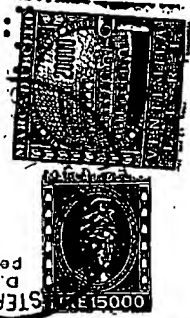
risultati ottenuti indicano che le DC così ottenute hanno potente funzione APC come dimostrato dalla loro capacità di indurre proliferazione di linfociti umani se comparata a quella dei macrofagi (Figura 16 A), e di indurre la proliferazione di linfociti T di scimmia a tutte le concentrazioni usate (Figura 16 B).

Per quanto concerne l'utilizzo delle DC per la vaccinazione, le DC, risospese alla concentrazione di $1 \times 10^5/100$ ml in RPMI 1640 contenente il 5% di siero autologo, 10 mM di Hepes buffer, 100 U/ml di penicillina-streptomicina, 0.5 mg/ml di amfotericina B, e glutammina allo 0.03% saranno incubate per 2 ore a 37° C in presenza di Tat o di suoi peptidi o delle combinazioni Tat, Rev, Nef, Gag e/o citochine e successivamente inoculate 2 o piu' volte a distanza di 2-4 settimane per via endovenosa. Alternativamente, le cellule dendritiche verranno trasdotte con vettori contenenti il gene tat da solo o associato con gli altri vettori summenzionati e successivamente inoculate endovena.".

Postilla 68: Pagina 59 della descrizione: Riga 1: dopo la parola "gordonii" radiare "commensale della cattività orale dell'uomo) e inserire "e Lactobacillus)".

Postilla 69: Pagina 59 della descrizione: Riga 7: dopo la parola "Vaccine" radiare "1997, in press] e inserire: "15:1330 (1997); Pozzi et al., in "Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal

H 02.03.97



immunization", eds. Pozzi G. & Wells, J.M. – Landes, Austin, p. 35 (1997); Oggioni, et al., Gene 169:85 (1996); Rush, et al., in "Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization", eds. Pozzi G. & Wells, J.M. – Landes, Austin, p. 107 (1997); Medaglini et al., Biothec. Annu. Rev. 3:297 (1997); Medaglini et al., Am. J. Reprod. Immunol. 39:199 (1998)]. Questi batteri funzionano come vettori vivi di vaccini, ed hanno il vantaggio di offrire una stimolazione prolungata del sistema immunitario. Verrà inoltre valutata la possibilità di coesprimere sulla superficie batterica Ag virali e molecole coadiuvanti la risposta immunitaria quali la subunità B della tossina termolabile di *E. coli* o citochine. Per la preparazione dei ceppi ricombinanti di *S. Gordonii* si seguirà la strategia precedentemente descritta [Oggioni et al., Vaccine 13:775 (1995)]. In breve: (i) integrazione cromosomica delle molecole di DNA ricombinante; (ii) fusioni trascrizionali con promotori cromosomici forti; (iii) fusioni traduzionali con il gene di una proteina streptococcica di superficie (proteina M6). I ceppi ricombinanti di *S. Gordonii* verranno utilizzati per colonizzare la mucosa vaginale delle scimmie. E' stato dimostrato che i ceppi ricombinanti di *S. Gordonii* che esprimono il V3 della gp120 e la proteina E7 di HPV-16 colonizzano in maniera stabile la mucosa vaginale del topo dopo un singolo inoculo, inducendo una risposta anticorpale Ag-specifica sia locale che

sistemica con prevalenza in quest'ultima di IgG2a, che suggerisce una risposta di tipo Th1 [Medaglini et al., Biotech. Annu. Rev. 3:297 (1997); Medaglini et al., Vaccine 15:1330 (1997)]. Saranno selezionati ceppi di lattobacilli vaginali umani che siano in grado di colonizzare la mucosa vaginale della scimmia e quindi si utilizzerà un sistema genetico, già sviluppato, che consente l'espressione di Ag eterologhi sulla superficie dei lattobacilli (Rush, 1997). La strategia utilizzata si basa su: (i) clonaggio delle fusioni geniche (*emm6*/gene eterologo) in vettori di inserzione che portano omologie con il trasposone coniugativo Tn916; (ii) trasformazione di questi vettori in ceppi batterici che fungono da ospite intermedio (*Bacillus subtilis*); (iii) mobilizzazione coniugativa dei trasposoni ricombinanti da *B. subtilis* a ceppi di *Lactobacillus*. I ceppi ricombinanti di *Lactobacillus* saranno utilizzati per colonizzare la mucosa vaginale dell scimmie.

Campioni vaginali verranno prelevati utilizzando speciali filtri assorbenti [Di Fabio et al., submitted; Medaglini et al., Biotech. Annu. Rev. 3:297 (1997); Medaglini et al., Vaccine 15:1330 (1997)]. La colonizzazione verrà valutata piastrando i campioni vaginali su piastre selettive e l'espressione degli Ag di HIV-1 *in vivo* verrà valutata tramite immunofluorescenza degli strisci vaginali assorbenti [Medaglini et al., Biotech. Annu. Rev. 3:297 (1997)]. Con metodiche già standardizzate

[Di Fabio et al., submitted], i campioni vaginali verranno utilizzati per i) analisi dello striscio vaginale tramite test di Papanicolau, nel caso di vaccinazione vaginale; ii) presenza nelle cellule di antigeni vaccinali; iii) caratterizzazione fenotipica delle cellule mediante analisi citofluorometrica (CD1, CD2, CD4, CD5, CD8, CD11c, CD14, CD20, CD28, CD40, CD25, HLA-DR); iv) valutazione della espressione di citochine (IL-2, IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, IL-15, RT-PCR semiquantitativa), determinazione di citochine e chemochine nei liquidi mucosali, tramite saggi ELISA; v) dosaggio delle immunoglobuline (IgA, IgG) presenti nel fluido mucosale tramite ELISA [Di Fabio et al., Vaccine 15: 1 (1997)]. Verranno dosate in ciascun campione le immunoglobuline totali e specifiche. Un mese dopo l'ultima vaccinazione le scimmie saranno infettate per via endovenosa o mucosale con lo SHIV 89.6P. Il follow-up delle scimmie sarà effettuato

come descritto nell'Esempio 4. Verranno prelevati campioni di sangue per eseguire gli esami di laboratorio, la valutazione di parametri immunologici, umorali e cellulari, come descritto nell'Esempio 4."

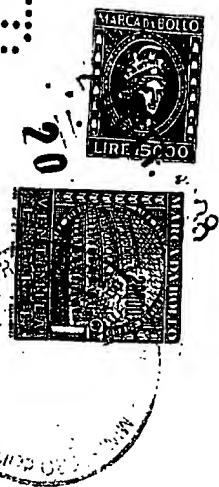
Postilla 70: Pagina 59 della descrizione: Riga 9: dopo la parola "scimmie" radiare "cynomolgus".

Postilla 71: Pagina 59 della descrizione: Riga 11: dopo la parola "indotta" radiare: "con gli immunogeni proteici descritti sopra, " e

inserirne "somministrando gli immunogeni proteici, descritti sopra, direttamente per via mucosale in presenza di adiuvanti, quali la tossina termolabile di *E. coli* e la tossina colerica, oppure".

Postilla 72: Pagina 59 della descrizione: Dopo l'ultima riga, andare a capo e inserire: " L'inventore ritiene, inoltre, che vettori erpetici ricombinanti, esprimenti le proteine virali sopra descritte possano essere ottimi sistemi per indurre un'efficace immunità mucosale. Si utilizzeranno vettori virali ricombinanti del virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) per esprimere proteine virali per l'induzione di una risposta sistemica (mediante immunizzazione cutanea, i.d.) e mucosale (per via orale, vaginale o nasale). Si utilizzeranno vettori erpetici non replicativi, apatogeni [Marconi et al., Proc. Natl. Acad. Sci 93:11319 (1996)]. Si sfrutta l'abilità di questi vettori di contenere estese sequenze esogene senza interferire nell'efficienza d'infezione [Glorioso et al., Ann. Rev. Microbiol. 49:675 (1995); Huard et al. Gene Ther. 2:385 (1995)]. Si costruiranno vettori capaci di contenere più geni di HIV (regolatori, accessori e strutturali). L'immunità mucosale potrebbe richiedere l'uso di un vaccino somministrato oralmente, per via vaginale o nasale. I vettori erpetici possono essere interessanti per questi approcci vaccinali data la capacità di HSV-1 di essere somministrato in modo diretto per via mucosale [Bowen et al., Res. Virol. 143:269

H 02.03.99



(1992); Kuklin et al., J. Virol. 240:245 (1998)]. I virus ricombinanti saranno costruiti utilizzando un metodo a due steps che facilita l'inserzione di sequenze esogene nel genoma virale. Il primo step richiede l'inserzione di una cassetta di espressione con un gene reporter (β -galactosidase, LacZ) clonato nel sito di restrizione PacI, non presente nel genoma virale di HSV-1, fiancheggiato dalla desiderata sequenza target di HSV-1, usando la procedura standard di ricombinazione omologa per interrompere il gene di HSV-1. Il ricombinante viene selezionato per la formazione di placche con un fenotipo blu, utilizzando "l'x-gal staining". La digestione del DNA virale con PacI porta al rilascio del gene marker e alla generazione di due grandi frammenti di DNA virale incapaci di produrre particelle virali infettanti. Il secondo step consiste in una co-trasfezione del DNA virale digerito con lo stesso plasmide usato per creare la delezione, dove il gene reporter è sostituito dal gene desiderato. I ricombinanti saranno identificati attraverso la selezione di placche con un fenotipo bianco dopo colorazione con x-gal. Questa ricombinazione porterà anche alla eliminazione dei siti PacI permettendo di usare questo metodo

ripetutamente per inserire molti geni in diversi loci del genoma virale di HSV-1 [Krisky et al., Gene Ther. 4:1120 (1997)]. L'incrocio dei diversi vettori contenenti i singoli geni permetterà di creare geneticamente

H 02.03.99

tutte le diverse combinazioni. Attraverso lo screening con diversi markers, fenotipi e crescita selettiva su cellule completanti sarà possibile isolare il vettore contenente tutti i geni desiderati. Tutte le combinazioni saranno quindi create con l'alternarsi di trasfezioni di DNA e ricombinazioni di virus.

Saranno costruiti vettori esprimenti i singoli geni tat, rev, nef o gag, utilizzando come vettore di base quello contenente le mutazioni nei geni 4-/22-/27-/41-, che è considerato superiore in termini di ridotta tossicità ed estesa espressione del gene esogeno, rispetto ad altri vettori HSV-1 non replicativi. Saranno usati promotori costitutivi quali HCMV (human cytomegalovirus immediate early promoter), l'ICP0 Iep (infected cell protein immediate early promoter) ed il Moloney Murine Leukemia virus LTR, per indurre l'espressione dei geni sopra menzionati.

Saranno costruiti vettori HSV-1 non replicativi esprimenti proteine di HIV in diverse combinazioni. La produzione di questi virus contenenti più geni sarà realizzata tramite un crossing over genetico dei vettori contenenti i singoli geni descritti nel punto precedente. Saranno creati doppi, tripli e quadrupli vettori.

I vettori saranno utilizzati per l'inoculazione nelle scimmie i.d. o per via mucosale (orale, vaginale o nasale) con particolare attenzione a

quest'ultimo tipo di somministrazione [Bowen et al., Res. Virol. 143:269 (1992); McLean et al., J. Infect. Dis. 66:341 (1994) e Vaccine 14:987 (1996)]. Lo schema di vaccinazione prevede inoculi multipli ad intervalli di tempo da determinare a seconda dell'immunogeno o della combinazione di immunogeni. Durante l'immunizzazione gli animali saranno monitorati per la valutazione dei parametri ematochimici e immunologici come descritto nell'Esempio 4. Con metodiche già standardizzate (Di Fabio et al., submitted), verranno prelevati campioni vaginali che saranno studiati come descritto precedentemente in questo Esempio.

Esempio profetico 10.

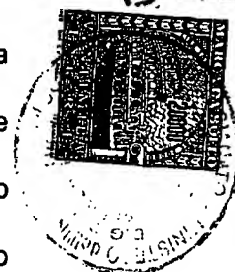
Sistemi di delivery

Tat (proteina e/o DNA) da sola o in combinazione con gli altri sopra descritti verrà inoculata utilizzando nuovi sistemi di delivery, quali eritrociti o nanoparticelle.

Per quanto riguarda gli eritrociti come sistemi di delivery, la procedura proposta si basa sulla possibilità di veicolare antigeni legati sulla membrana di eritrociti autologhi. Gli eritrociti, alla fine della loro vita (nell'uomo 120 giorni), sono rimossi dal circolo dalle cellule del sistema macrofagico, notoriamente professioniste della presentazione dell'antigene. Questa proprietà può essere opportunamente sfruttata a

scopi vaccinali. Pertanto, si utilizzerà una tecnica che permette di legare l'antigene sulla membrana degli eritrociti [Magnani et al., Biotech. Appl. Biochem. 16: 188 (1992); Magnani et al., Biotech. Appl. Biochem. 20: 335 (1994)], e di conservarne le sue capacità immunogeniche [Chiarantini et al., Vaccine 15: 276 (1997); Chiarantini et al., Clin. Diag. Lab. Immunol. 5: 235 (1998)]. Tramite tale procedura, gli eritrociti possono essere biotinilati senza essere danneggiati e senza alterare significativamente la loro sopravvivenza in circolo [Magnani et al., Biotech. Appl. Biochem. 16: 188 (1992)]. Gli eritrociti biotinilati possono funzionare come carrier per immunogeni quando questi siano opportunamente biotinilati. Gli eritrociti così modificati circolano normalmente fino a quando non sono rimossi dal sistema macrofagico che presenterà l'antigene inducendo una risposta immune. La conseguente produzione di anticorpi opsonizzerà gli eritrociti leganti l'antigene accelerandone la rimozione dal circolo. I principali vantaggi di tale metodica sono riconducibili alla ridotta quantità di antigene necessaria per indurre una risposta umorale e cellulare, alla possibilità di una immunizzazione protratta per tutto il periodo di permanenza in circolo dell'eritrocita legante l'antigene e ad un effetto adiuvante esercitato dal sistema stesso. E' stato infatti dimostrato negli animali da esperimento che la somministrazione dello

H 02.03.99



stesso antigene legato sulla membrana di eritrociti autologhi induce una risposta immunitaria negli animali uguale o superiore a quella ottenuta con l'uso dell'adiuvante di Freund [Chiarantini et al., Vaccine 15: 276 (1997)]. Queste proprietà sono estremamente utili per lo sviluppo di un vaccino anti-HIV; in particolare quando sia necessario incrementare l'immunogenicità dell'antigene, quando la disponibilità dell'antigene costituisca un fattore limitante e quando, in particolare, si voglia ottenere una vaccinazione con un ridotto numero di immunizzazioni. Inoltre tale strategia potrà essere importante qualora si voglia evitare la somministrazione di un adiuvante. Infatti, è stato dimostrato, nel modello murino, che la somministrazione di antigene mediante eritrociti autologhi produce risposte immunitarie uguali o superiori a quelle ottenute con il più forte adiuvante in commercio (adiuvante di Freund) [Chiarantini et al., Vaccine 15: 276 (1997)], che, in aggiunta, non può essere utilizzato nell'uomo a causa dei suoi effetti collaterali. Pertanto si potrà valutare nei primati non umani l'effetto adiuvante di eritrociti leganti la proteina Tat da sola o in combinazione con gli altri immunogeni descritti precedentemente utilizzando come riferimento le risposte immunologiche ottenute con la somministrazione degli stessi immunogeni con Alum, RIBI o ISCOM.

Un'ulteriore strategia di delivery è rappresentata dalle nanoparticelle.

Nanoparticelle funzionali rappresentano sistemi estremamente interessanti per il trasporto ed il rilascio controllato di proteine e DNA [Chavany et al., Phar. Res. 9: 441 (1994); Zobel et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7: 483 (1997)] in quanto possono essere realizzate con elevato grado di affinità nei confronti di queste molecole biologicamente attive. Le nanosfere sono particelle polimeriche colloidali, di differente composizione chimica, variabili in grandezza da 10 a 1000 nm. Alla superficie, o al loro interno, è possibile adsorbire sostanze di diversa natura (oligonucleotidi, farmaci, proteine, peptidi, DNA) che vengono in tal modo veicolate nel citoplasma o nel nucleo della cellula dove sono rilasciate gradualmente. Queste proprietà, inoltre, permettono di utilizzare quantità estremamente basse di sostanza. Le nanoparticelle costituiscono quindi un ottimo sistema di

delivery soprattutto per quelle sostanze che, per loro natura, sarebbero instabili nell'ambiente intracellulare o di cui si voglia aumentare l'efficacia o la veicolazione verso cellule specifiche.

L'inventore ritiene che nanosfere possano essere con efficacia utilizzate come sistema di delivery degli antigeni virali sopra descritti.

E' possibile preparare e caratterizzare tre tipi di nanosfere progettate per la veicolazione ed il rilascio controllato di DNA (nanosfere tipo 1 e

2) e proteine (nanosfere tipo 3). Per quanto riguarda la veicolazione di DNA, si possono preparare due tipi di nanosfere (nanosfere tipo 1 e 2). Il primo tipo di nanosfere (nanosfere tipo 1) ha struttura a triplo strato costituita da uno strato più esterno a base di catene di polioossietilenglicole (PEG) che, sulla base di recenti studi sui sistemi stealth [Allen et al., Biochim. Biophys. Acta 1237: 99 (1995); Lasic et al., Chemical Reviews 95: 2601 (1995)], dovrebbero rendere le nanosfere invisibili alle cellule di Kupfer, uno strato più interno costituito da monomeri con caratteristiche di tensioattivi contenenti gruppi ammoniaci quaternari in grado di adsorbire reversibilmente il DNA attraverso un meccanismo di scambio ionico, ed un core interno a base di metilmetacrilato come monomero. Queste nanosfere si ottengono mediante polimerizzazione in microemulsione che prevede la polimerizzazione di un monomero vinilico o vinilidenico in presenza di una miscela di tensioattivi reattivi, cioè in grado di partecipare alla polimerizzazione del monomero, di cui uno deve presentare un gruppo ammonico quaternario in grado di interagire con gli oligonucleotidi e l'altro deve presentare una lunga catena di PEG (M. Laus, It. Pat. BO97A 000641).

Il secondo tipo di veicolante del DNA è costituito da nano e microsfeere funzionali (nanosfere di tipo 2) con caratteristiche di idrogel. La

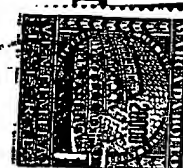
formazione di queste nanosfere dovrebbe avvenire in presenza della soluzione di DNA intrappolandolo così all' interno del veicolante.

Per quanto riguarda le proteine, si preparano delle nanosfere core-shell (nanosfere di tipo 3) costituite da un core interno di polimetilmetacrilato e da un guscio esterno fatto da un copolimero idrosolubile statistico di acido acrilico e di metilmetacrilato, caratterizzate da un elevato grado di affinità nei confronti delle proteine (Laus et al., Polymer 37: 343 (1996); Laus et al., Polymers for Adv. Techn. 7: 548 (1996)). Questo copolimero è commerciale (EUDRAGIT) ed è ottenibile con varie percentuali dei due comonomeri. Il processo di preparazione che porta all'ottenimento di questo secondo tipo di nanosfere, è costituito dalla polimerizzazione in dispersione. La sintesi prevede la polimerizzazione radicalica di un monomero vinilico o vinilidenico in presenza dell'EUDRAGIT che funge da stabilizzante

sterico. Dopo la nucleazione delle nanosfere l'EUDRAGIT si dispone esternamente alle particelle. Variando quindi la concentrazione dell'iniziatore radicalico, il rapporto tra il monomero e l'EUDRAGIT ed il tempo di reazione, si ottengono vari campioni di nanosfere con caratteristiche morfologiche e chimiche variegata.

Pertanto si potrà valutare se Tat proteico o a DNA, da solo o in combinazione con gli immunogeni (proteici o a DNA) sopra citati,

H 02.03.



veicolati da nanoparticelle siano in grado di indurre una risposta immune verso l'HIV, sia umorale che cellulo-mediata, più intensa o prolungata in paragone a quella indotta dagli immunogeni non veicolati nel modello della scimmia.

L'inventore ritiene che le informazioni derivanti da tali studi possano essere di estrema utilità per lo sviluppo di un vaccino anti-HIV. Inoltre, le informazioni derivanti dalla sperimentazione potranno essere trasferite anche ad altri studi vaccinali, in particolar modo quando vengano impiegate proteine o peptidi ricombinanti con bassa immunogenità. La possibilità di sviluppare uno schema vaccinale a singola somministrazione porterebbe incredibili vantaggi in termini di efficacia degli schemi vaccinali e alla riduzione dei costi di gestione di programmi di vaccinazione.

Postilla 73: Pagine 60 e 61 della descrizione: **radiare tutte le rivendicazioni e sostituire con:**

"1. Vaccino proteico o peptidico o a DNA, profilattico e/o terapeutico, contro l'AIDS, i tumori, le sindromi ed i sintomi associati all'infezione da HIV, comprendente la proteina Tat wild-type nella sua forma attiva e/o suoi mutanti e/o relative porzioni di proteina o peptidi, o il DNA codificante per dette proteine o dette porzioni o peptidi.

2. Vaccino secondo la riv. 1 in cui Tat ha la seguente sequenza nucleotidica (Seq. 1):

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG
GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA
ATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3' e qualsiasi
altra variante di Tat di qualsiasi tipo o sottotipo di HIV.

3. Vaccino secondo la riv. 1 in cui Tat ha la seguente sequenza aminoacidica:

NH2-EPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNICYCKKCCFHCQVCFITKAISY
GRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH e
qualsiasi altra variante di Tat di qualsiasi tipo o sottotipo di HIV.

4. Vaccino secondo la riv. 1 in cui i mutanti sono scelti fra quelli aventi le seguenti sequenze nucleotidiche o parti di esse:

Sequenza nucleotidica del mutante cys22 (Seq. 2)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAACTGCGGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG

H 02.03.99

GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCA
ATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza nucleotidica lys41 (Seq. 3)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG
GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCA
ATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza nucleotidica del mutante RGD Δ (Seq. 4)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG
GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCA
ATCCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza nucleotidica del mutante lys41-RGD Δ (Seq. 5)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG

H 02.03.99

GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA

ATCCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

5. Vaccino secondo la riv. 1 in cui i mutanti sono scelti fra quelli aventi

le seguenti sequenze amminoacidiche o parti di esse:

Sequenza amminoacidica del mutante cys22

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTAGTNCYCKKCCFHCQVCFITKA

LGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Sequenza amminoacidica lys41

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG

ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Sequenza amminoacidica del mutante RGDΔ

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALG

ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

Sequenza amminoacidica del mutante lys41-RGDΔ

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG

ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

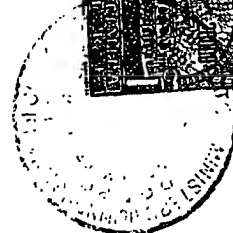
6. Vaccino secondo la riv. 1 in cui le porzioni di Tat sono scelte fra le

sequenze peptidiche

Pep. 1. MEPVDPRLEPWKHPGSQPKT

Pep. 2. ACTNCYCKKCCFHCQVCFIT

H 000000



Pep. 3. QVCFITKALGISYGRK

Pep. 4. SYGRKKRRQRRRPPQ

Pep. 5. RPPQGSQTHQVLSKQ

Pep. 6. HQVLSKQPTSQSRGD

Pep. 7. PTSQSRGDPTGPKE

7. Vaccino secondo le riv. 1-6 comprendente proteine o peptidi coniugati con l'epitopo T-helper universale del tossoide tetanico o altri peptidi T-helper;

8. Vaccino secondo le riv. 1-7 in combinazione con proteine ricombinanti o peptidi di Nef, Rev o Gag di HIV, o loro parti.

9. Vaccino secondo la riv. 1 comprendente proteine di fusione Tat (wild type o suoi mutanti)/Nef, Tat (wild type o suoi mutanti)/Rev, Tat (wild type o suoi mutanti)/Gag o parte delle stesse.

10. Vaccino secondo le riv. 1-9 in combinazione con proteine ricombinanti di citochine immunomodulatorie o altre molecole, o parti delle stesse, potenzianti la risposta immune antivirale.

11. Vaccino secondo la riv. 1 in cui le citochine sono IL-12 e/o IL-15.

12. Vaccino secondo la riv. 1 comprendente proteine di fusione Tat (wild type o suoi mutanti)/citochine immunomodulatorie, Tat (wild type o suoi mutanti)/IL12, Tat (wild type o suoi mutanti)/IL-15, Tat (wild type o

suoi mutanti)/altre molecole, o parte delle stesse, potenzianti la risposta immune antivirale.

13. Vaccino a DNA secondo le riv. 1, 2, 4 comprendente DNA codificante Tat wild-type o i suoi mutanti o parti di essi, inserito in un vettore di espressione.

14. Vaccino a DNA secondo le riv. 1, 2, 4 in combinazione con un vettore di espressione comprendente geni rev, nef e gag di HIV, o parte degli stessi.

15. Vaccino a DNA secondo le riv. 13 o 14 in cui il vettore è un plasmide co-esprimente tat (wild-type o i suoi mutanti)/rev, tat (wild-type o i suoi mutanti)/nef, tat (wild-type o i suoi mutanti)/gag o parti degli stessi.

16. Vaccino a DNA secondo le riv. 1, 2, 4 in combinazione con molecole a DNA inserite in un vettore di espressione codificante citochine immunomodulatrici o altri immunomodulatori, o parte degli stessi, potenzianti la risposta immune antivirale.

17. Vaccino a DNA secondo la riv. 16 in cui la citochina è IL-12 e/o IL-15.

18. Vaccino a DNA secondo le riv. 16 o 17 in cui il vettore è un plasmide co-esprimente tat (wild-type o suoi mutanti)/IL-12, tat (wild-type o suoi mutanti)/IL-15, tat (wild-type o suoi mutanti)/altre molecole, o loro parti, in grado di potenziare la risposta immune antivirale.

19. Vaccino secondo le riv. 13-18 in cui il vettore è pCV0.
20. Vaccino secondo le riv. precedenti comprendente cellule dendritiche autologhe tal quali e/o modificate secondo le riv. precedenti.
21. Vaccino secondo le riv. precedenti comprendente adiuvanti che ne potenzino la risposta immune.
22. Vaccino secondo la riv. 21 in cui l'adiuvante è scelto fra Alum, ISCOM, RIBI e relative miscele.
23. Vaccino secondo le riv. precedenti comprendente sistemi di veicolazione e di rilascio.
24. Vaccino secondo la riv. 23 in cui detti sistemi sono scelti fra nanoparticelle, vettori erpetici, globuli rossi, batteri e relative combinazioni.
25. Vaccino secondo la riv. 24 in cui i batteri sono scelti fra lo *Streptococcus gordonii* e il *Lattobacillus*.
26. Vaccino secondo le riv. 24 e 25 in cui i batteri sono ingegnerizzati per esprimere antigeni virali.
27. Vaccino secondo le riv. precedenti per l'immunizzazione di cellule del sangue periferico di soggetti infettati, che siano espanse tramite co-stimolazione con anticorpi anti-CD3 e anti-CD28 supportati su biglie paramagnetiche.

28. Vaccino terapeutico secondo le riv. precedenti, combinato con inibitori della replicazione virale.

29. Vaccino secondo le riv. precedenti in cui il principio attivo è veicolato per l'immunizzazione mucosale (nasale, orale, vaginale o rettale).

30. Vaccino secondo le riv. precedenti in cui il principio attivo è somministrato per via sistemica o locale.

31. Vaccino secondo la riv. 30 in cui il principio attivo è somministrato per via intramuscolare, sottocute, intradermica.

32. Vaccino secondo le riv. 29-31 in cui il principio attivo è veicolato in siero autologo.

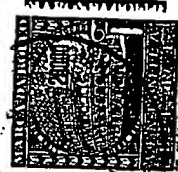
33. Sequenza nucleotidica di Tat (Seq. 1):

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG
GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA
ATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG 3'

34. Sequenza aminoacidica di Tat:

NH2-EPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKAISY

H 02.03.99



GRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

35. Proteina mutante di Tat avente la sequenza nucleotidica scelta fra:

Sequenza nucleotidica del mutante cys22 (Seq. 2)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAAACTGCGGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG
GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA
ATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza nucleotidica lys41 (Seq. 3)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG
GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA
ATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza nucleotidica del mutante RGD Δ (Seq. 4)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGG
AAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT
GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTC
CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG

GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA

ATCCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

Sequenza nucleotidica del mutante lys41-RGDΔ (Seq. 5)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTTGGAAGCATCCAGG

AAGTCAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTT

GCTTTCATTGCCAAGTTTGTTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTC

CTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAG

GCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCA

ATCCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG3'

36. Sequenza amminoacidica di mutanti di Tat scelta fra:

Sequenza amminoacidica del mutante cys22

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTAGTNCYCKKCCFHCQVCFITKA

LGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Sequenza amminoacidica lys41

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG

ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Sequenza amminoacidica del mutante RGDΔ

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALG

ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSPGPKE-COOH

Sequenza amminoacidica del mutante lys41-RGDD

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG

ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVLSLKQPTSQSPTGPKE-COOH

37. Mutante di Tat avente una sequenza peptidica scelta fra:

Pep. 1. MEPVDPRLEPWKHPGSQPKT

Pep. 2. ACTNCYCKKCCFHCQVCFIT

Pep. 3. QVCFITKALGISYGRK

Pep. 4. SYGRKKRRQRRRPPQ

Pep. 5. RPPQGSQTHQVLSLKQ

Pep. 6. HQVLSLKQPTSQSRGD

Pep. 7. PTSQSRGDPTGPKE

38. Vettore di espressione comprendente una sequenza di DNA scelta fra quelle indicate nelle riv. 33 e 35 o parti di esse.

39. Vettore di espressione pCV0 comprendente una sequenza di DNA scelta fra quelle indicate nelle riv. 33 e 35 o parti di esse.

40. Vettore di espressione pCV0 comprendente cDNA scelto fra quelli dei geni tat, rev, nef, gag, IL-12, IL-15 e relative combinazioni.

41. Cellula trasformata comprendente il vettore secondo le riv. 38-40.

42. Cellule dendritiche inoculate con Tat o suoi peptidi o mutanti o combinazioni con Rev, Nef e Gag e/o citochine.

43. Cellule dendritiche trasdotte con vettori di espressione contenenti il gene tat.

44. Processo per la produzione della proteina Tat o di suoi mutanti o di sue forme ricombinanti o parti di esse consistente nel coltivare la cellula secondo la riv. 41 e nell'isolare la proteina o una sua parte così prodotta.

45. Processo per la preparazione del vettore pCV0 comprendente un cDNA secondo la riv. 40 consistente nell'amplificare detto cDNA mediante tecnica PCR utilizzando primers scelti fra:

Seq. P1. Primer forward Rev: 5'ATGGCAGGAAGAAGC3'

Seq. P2. Primer reverse Rev: 5'CTATTCTTTAGTTCC3'

Seq. P3. Primer forward Nef: 5'ATGGGTGGCAAGTGG3'

Seq. P4. Primer reverse Nef: 5'TCAGCAGTCCTTGTA3'

Seq. P5. Primer forward Gag: 5'ATGGGTGCGAGAGCG3'

Seq. P6. Primer reverse Gag: 5'TTATTGTGACGAGGG3'

Seq. P7. Primer forward IL-12: 5'ATGTGGCCCCCTGGG3'

Seq. P8. Primer reverse IL-12: 5'TTAGGAAGCATTGAG3'

Seq. P9. Primer forward IL-15: 5'ATGAGAATTTGAAA3'

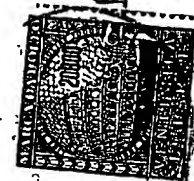
Seq. P10. Primer reverse IL-15: 5'TCAAGAAGTGTGAT3'

Seq. P11. Primer forward Tat: 5'ATGGAGCCAGTAGAT3'

Seq. P12. Primer reverse Tat: 5'CTATTCCTTCGGGCC3'

Seq. P13. Primer forward Tat/Rev: 5'GGCCCGAAGGAAATGGCA

H 00:00:00



GGAAGAAGC3'

Seq. P14. Primer forward Tat/Nef: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGT

GGCAAGTGG3'

Seq. P15. Primer forward Tat/Gag: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGTGCG

AGAGCG3'

Seq. P16. Primer forward Tat/IL-12: 5' GGCCCGAAGGAAATGTGGC

CCCCTGGG3'

Seq. P17. Primer forward Tat/IL-15: 5' GGCCCGAAGGAAATGAGAAT

TTCGAAA3'

46. Primer scelto fra:

Seq. P1. Primer forward Rev: 5'ATGGCAGGAAGAAGC3'

Seq. P2. Primer reverse Rev: 5'CTATTCTTTAGTTCC3'

Seq. P3. Primer forward Nef: 5'ATGGGTGGCAAGTGG3'

Seq. P4. Primer reverse Nef: 5'TCAGCAGTCCTTGTA3'

Seq. P5. Primer forward Gag: 5'ATGGGTGCGAGAGCG3'

Seq. P6. Primer reverse Gag: 5'TTATTGTGACGAGGG3'

Seq. P7. Primer forward IL-12: 5'ATGTGGCCCCCTGGG3'

Seq. P8. Primer reverse IL-12: 5'TTAGGAAGCATTGAG3'

Seq. P9. Primer forward IL-15: 5'ATGAGAATTCGAAA3'

Seq. P10. Primer reverse IL-15: 5'TCAAGAAGTGTTGAT3'

Seq. P11. Primer forward Tat: 5'ATGGAGCCAGTAGAT3'

Seq. P12. Primer reverse Tat: 5'CTATTCCTTCGGGCC3'

Seq. P13. Primer forward Tat/Rev: 5'GGCCCGAAGGAAATGGCA
GGAAGAAGC3'

Seq. P14. Primer forward Tat/Nef: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGT
GGCAAGTGG3'

Seq. P15. Primer forward Tat/Gag: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGTGCG
AGAGCG3'

Seq. P16. Primer forward Tat/IL-12: 5' GGCCCGAAGGAAATGTGGC
CCCCTGGG3'

Seq. P17. Primer forward Tat/IL-15: 5' GGCCCGAAGGAAATGAGAAT
TTCGAAA3'.

47. Processo per preparare un vaccino secondo le riv. precedenti in cui il principio attivo, in forma liofila, viene risospeso in siero autologo per la somministrazione.

48. Impiego di proteina Tat wild-type nella sua forma attiva e/o suoi mutanti e/o relative porzioni di proteina o peptidi o il DNA codificante per dette proteine o dette porzioni o peptidi per realizzare un vaccino

proteico o peptidico o a DNA, profilattico e/o terapeutico, contro l'AIDS, i tumori, le sindromi ed i sintomi associati all'infezione da HIV.

H 02.03.99

49. Impiego di adiuvanti Alum, ISCOM, RIBI da soli o in combinazione per realizzare un vaccino secondo la riv. 1.

50. Impiego di biglie paramagnetiche supportanti gli anticorpi monoclonali anti-CD3 e anti-CD28 per realizzare un vaccino secondo la riv. 1."

Postilla 74: Nel testo, ovunque si trovi la numerazione di tipo anglosassone **sostituirla** con la numerazione di tipo italiano.

Postilla 75: Sostituire le Figure con le Tavole da 1 a 16.

Roma, 20 OTT. 1998

Il Mandatario



Dr.ssa MARIA VITTORIA PRIMICERI
della NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

1354PTIT .

Tavola 1 di 16

H 02.07.99

Massimo Vittoni
NOTAR BARTOLO & GERVA SI S.p.A.

%AcetilL 0.3 76

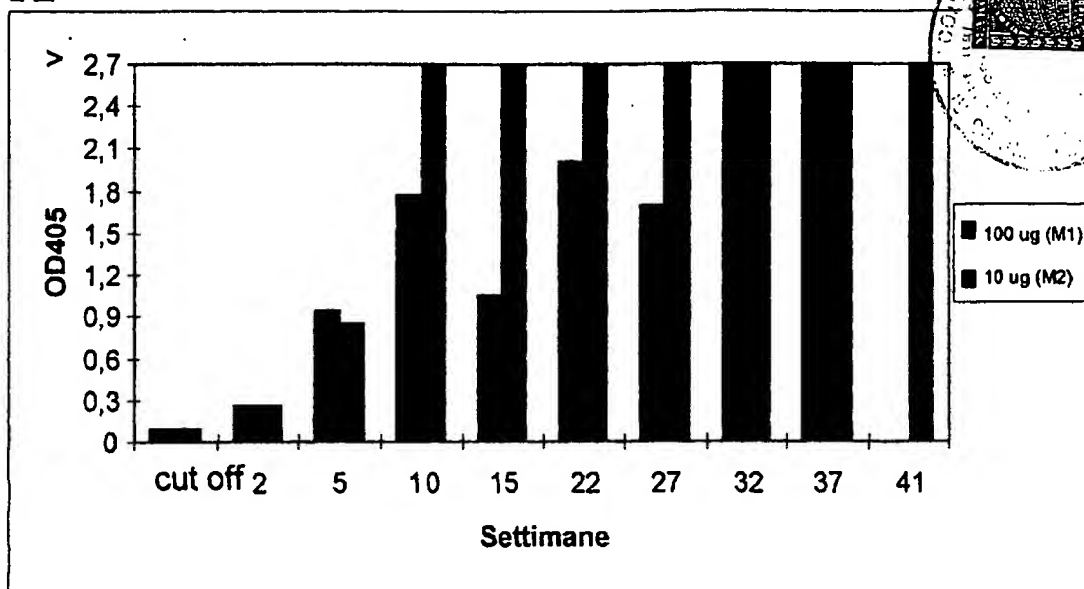
TAT	+	+
TAT22	+	

1354PTIT

Tavola 2 di 16

NOTA BARTOLO & GERVASI S.p.A.

A



B

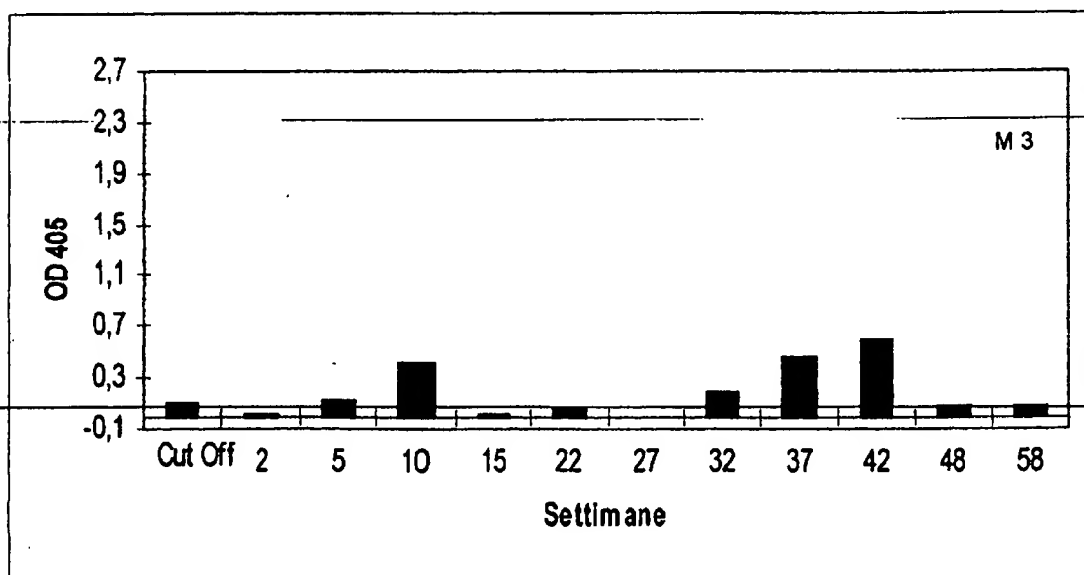


Fig. 2

Tavola 3 di 16

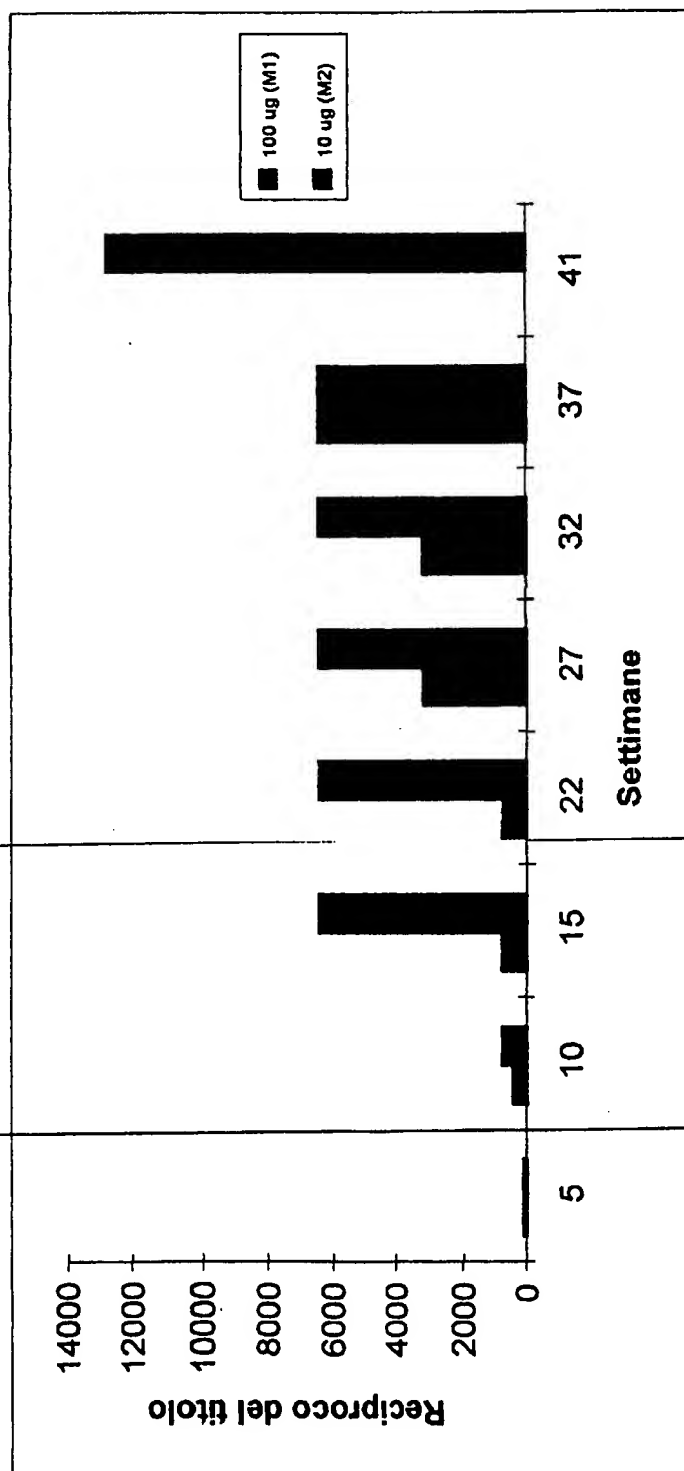


Fig. 3

Tavola 4 di 16

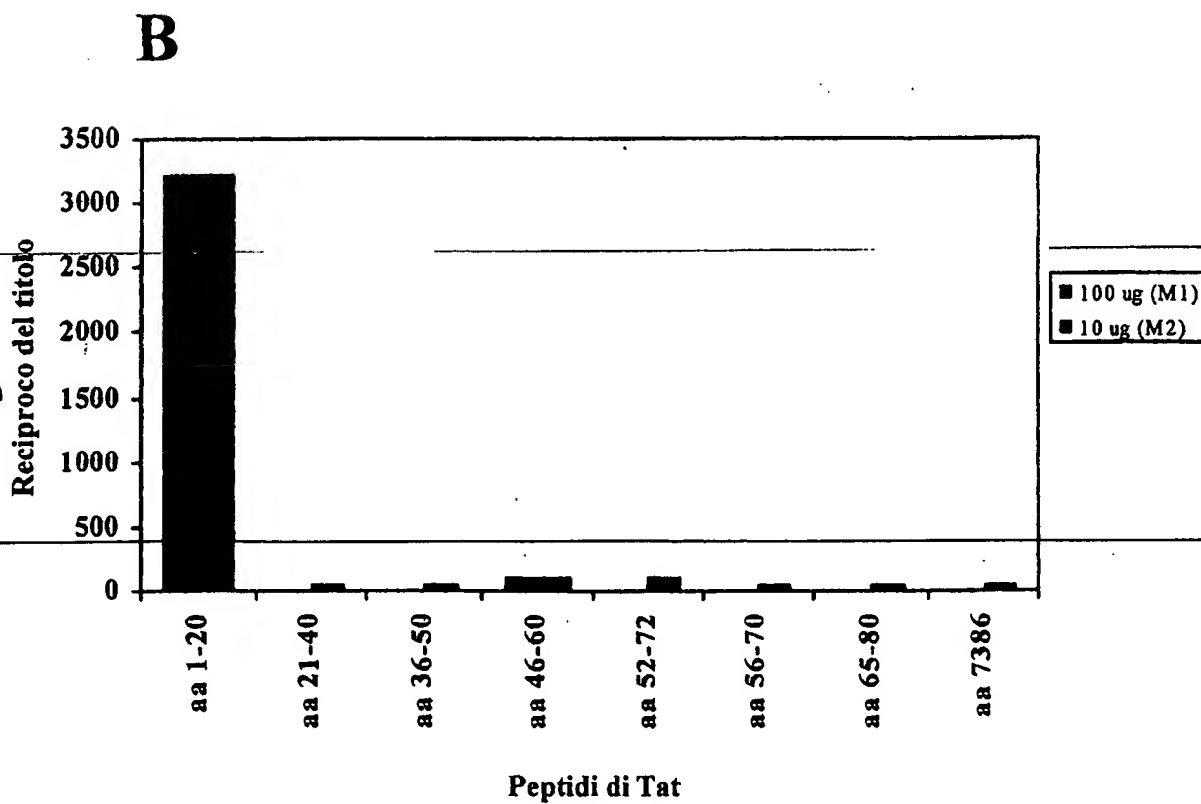
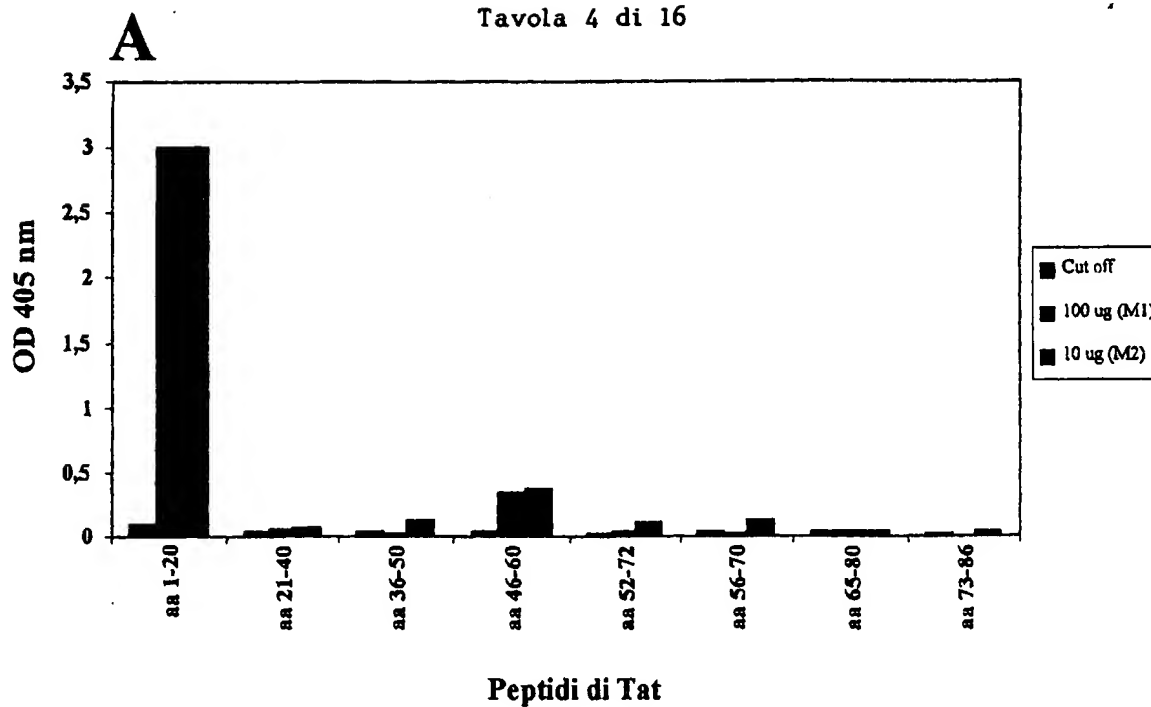


Fig. 4

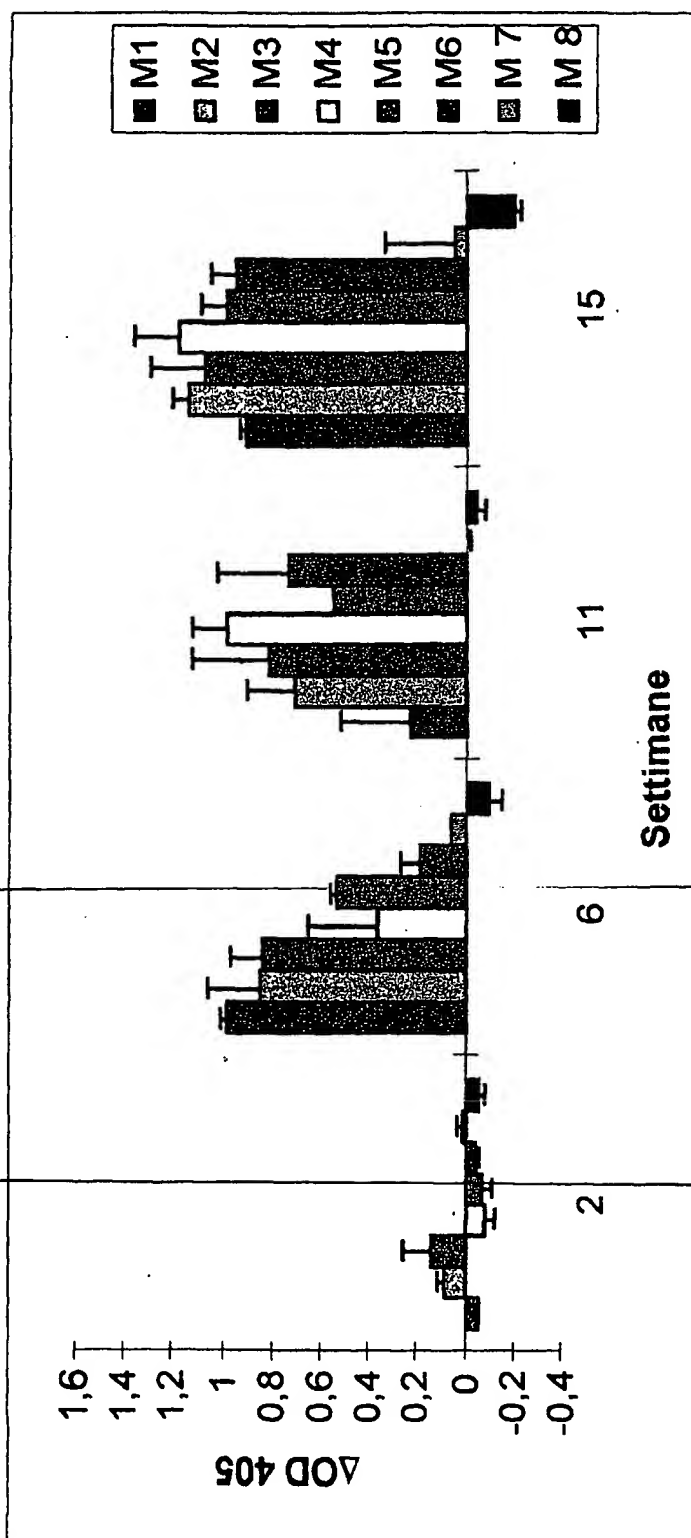


Fig. 5

1354PT1T

Notario Vittorio Neri
NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

Tavola 6 di 16

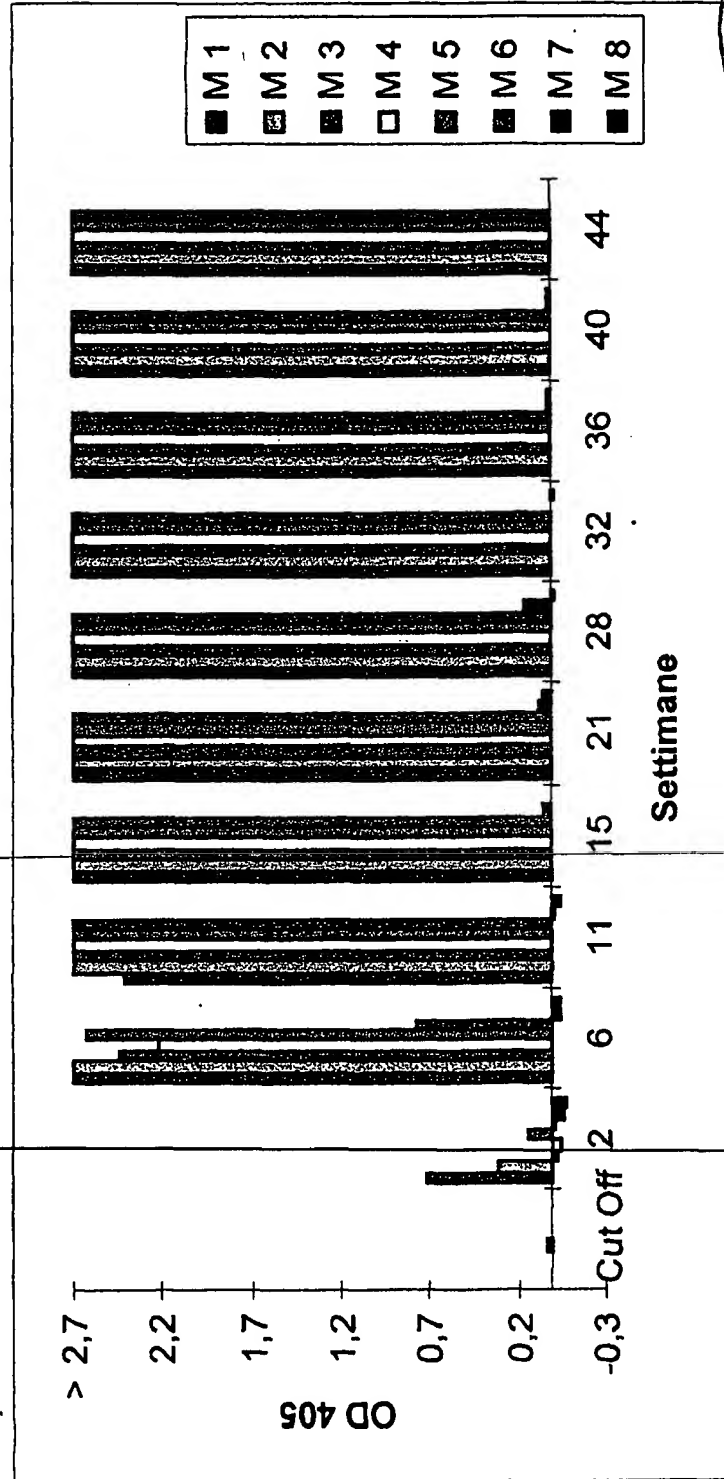


Fig. 6

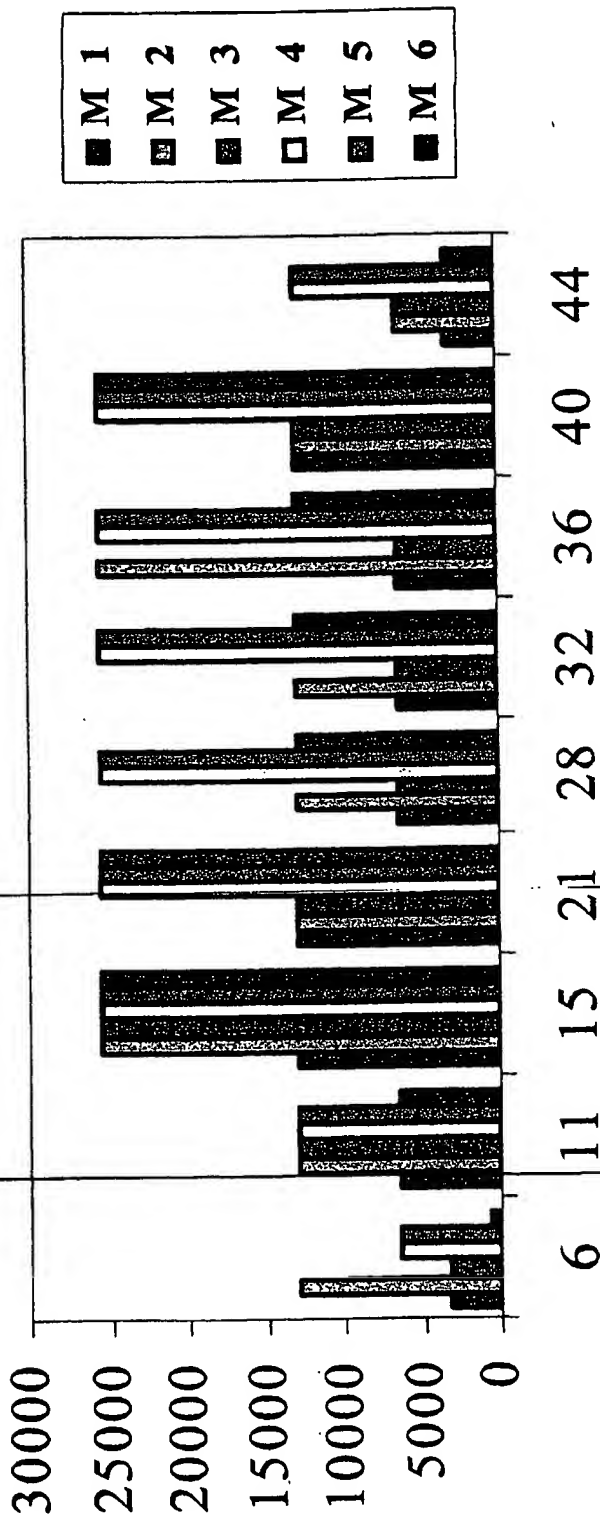


Fig. 7

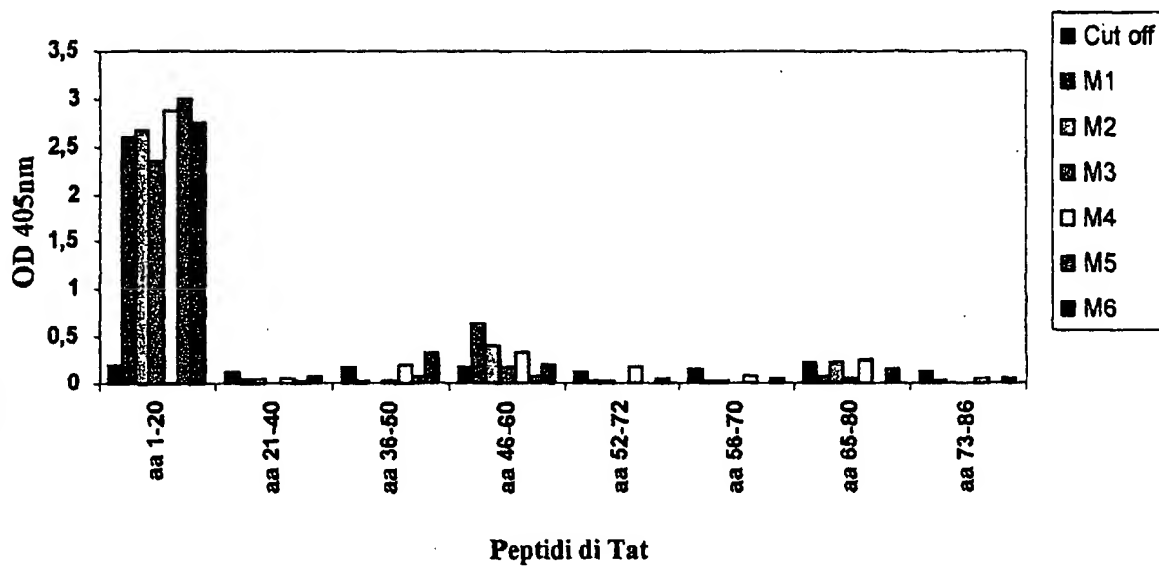
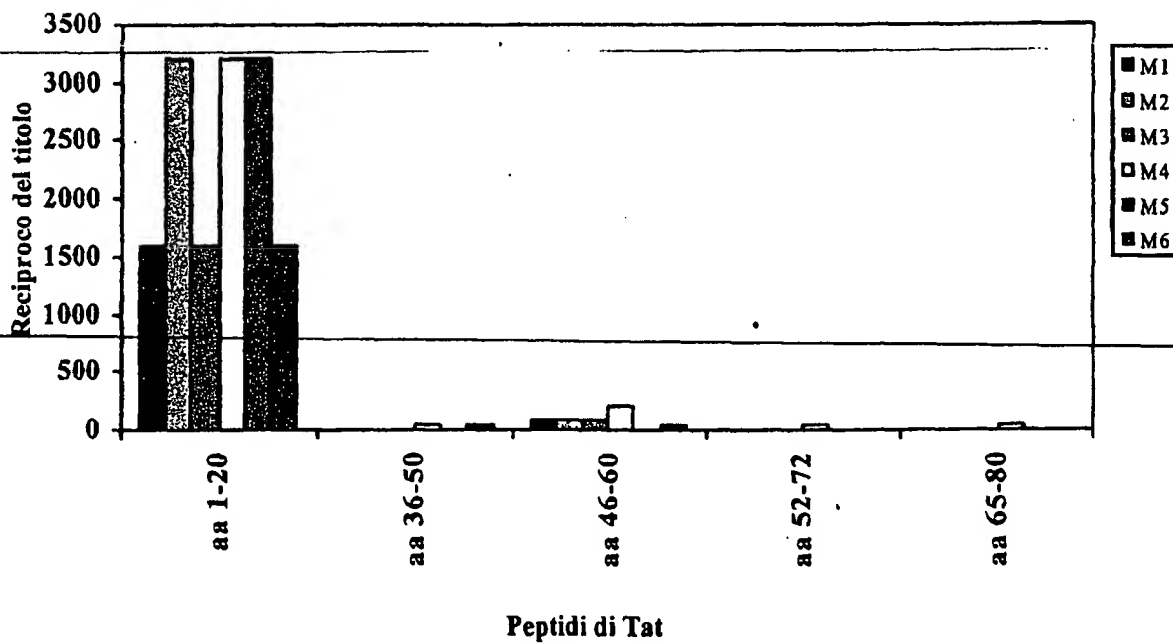
A**B**

Fig. 8

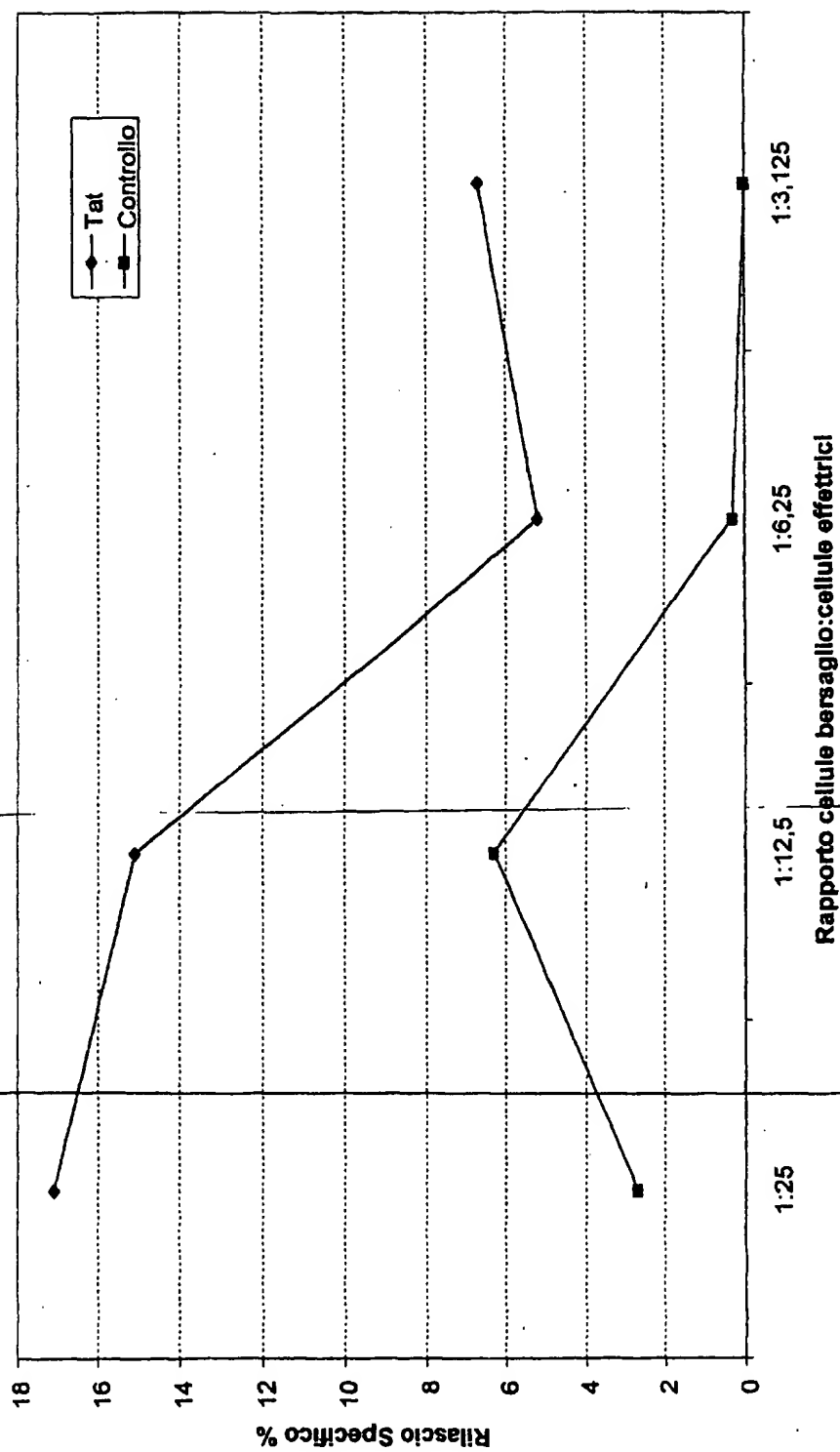
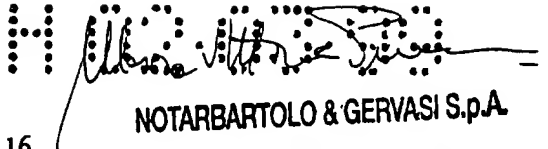


Fig. 9

1354PTIT

Tavola 10 di 16


NOTAR BARTOLO & GERVAZI S.p.A.

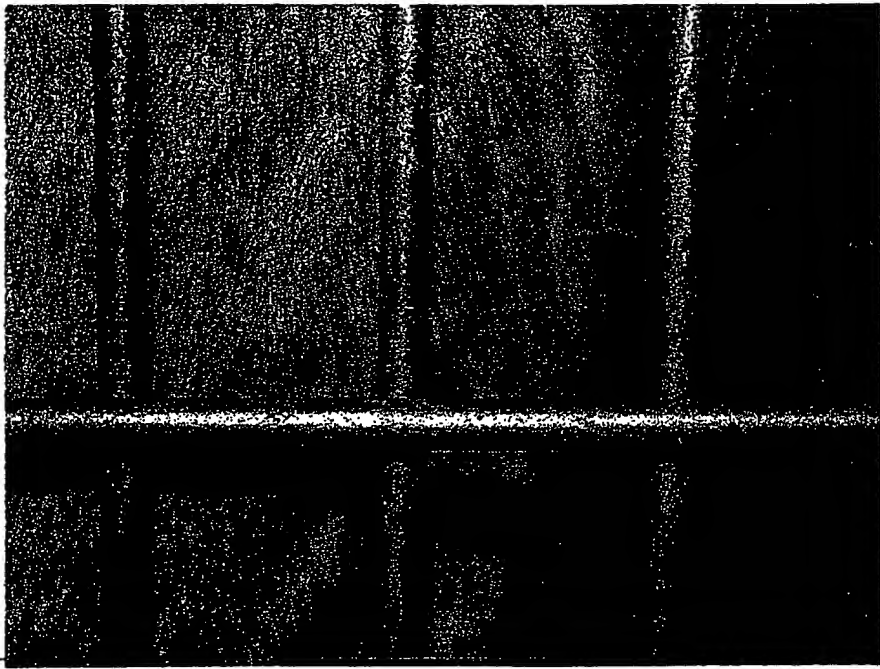


Fig. 10

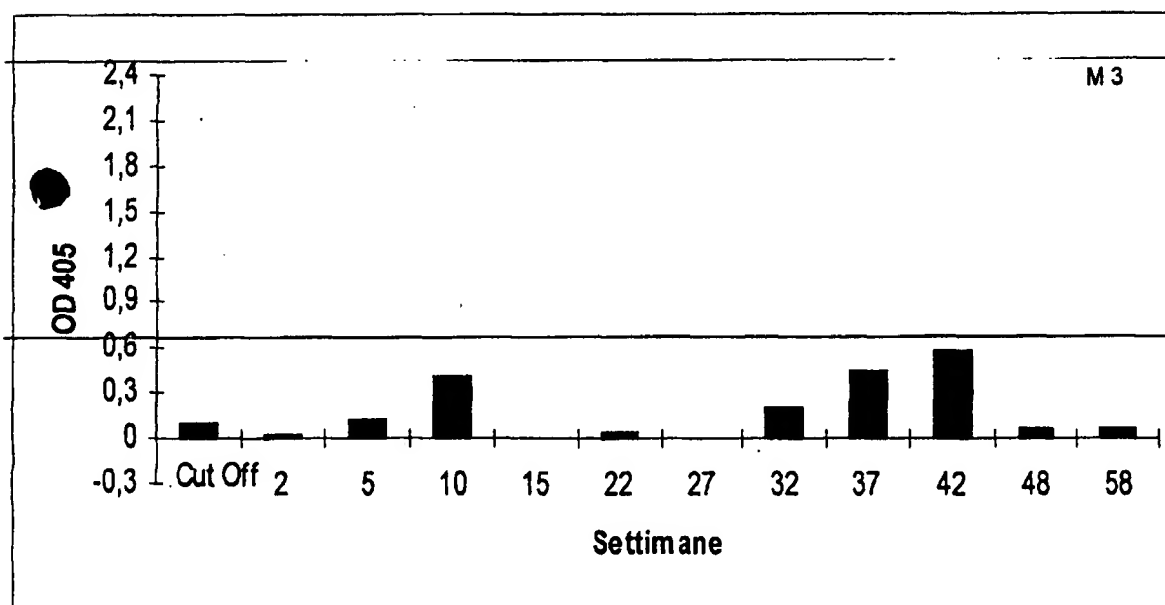
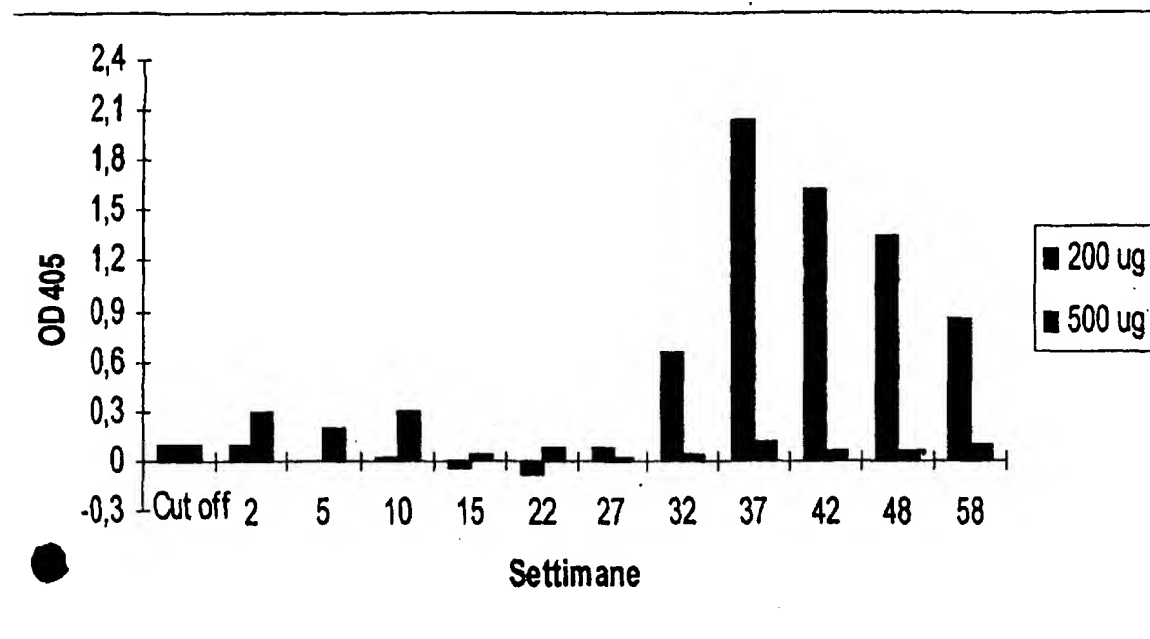


Fig. 11

1354PTIT

Tavola 12 di 16

H O O

Notar Bartolo & Gervasi
NOTAR BARTOLO & GERVASI S.p.A.

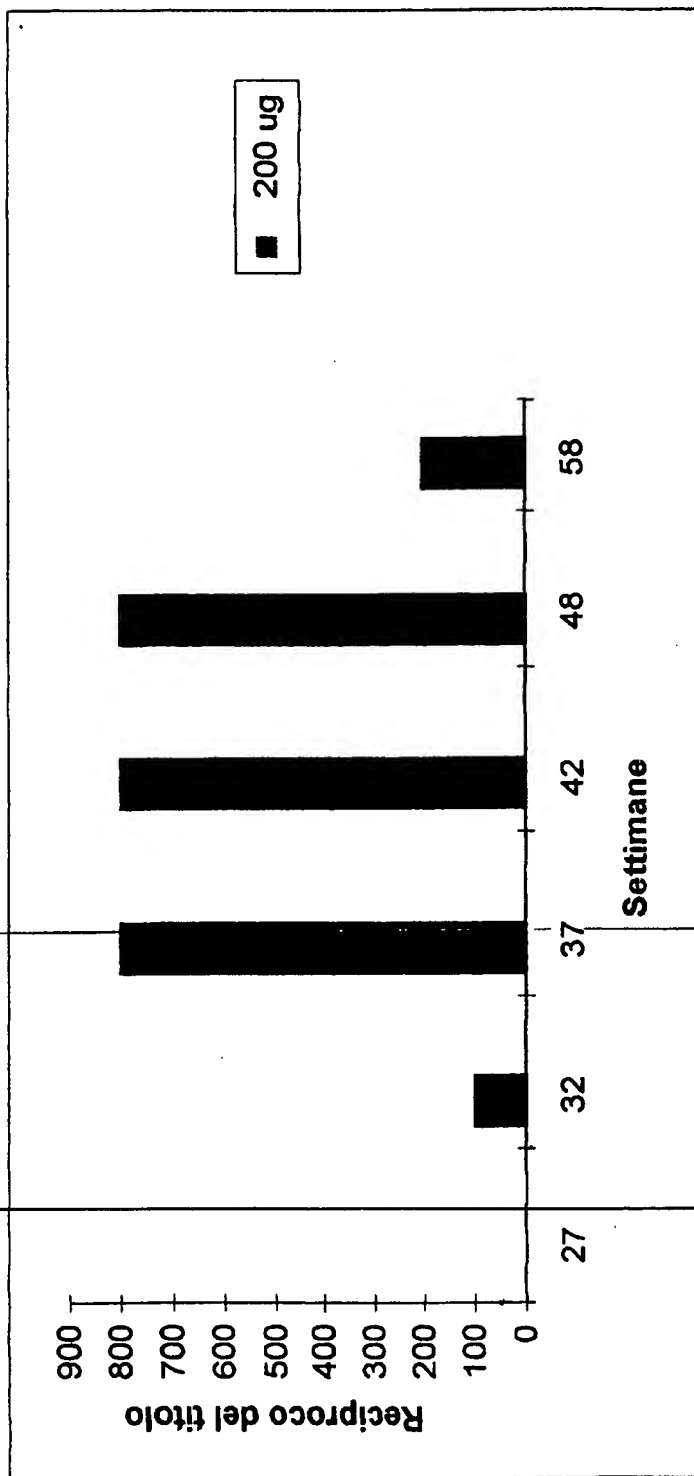


Fig. 12

A 5x5 grid of dots. The first three columns contain dots in rows 1, 2, 4, and 5. The fourth column contains dots in rows 1, 2, 3, 4, and 5. The fifth column contains dots in rows 1, 2, 3, 4, and 5. This arrangement of dots forms the letters 'H' and 'O'.

Please return me

Bar chart showing OD 405 values (Y-axis, ranging from -0.2 to 0.9) versus Settimane (X-axis, ranging from 0 to 44). The chart displays data for four media: M7 (stippled), M8 (solid black), M9 (white), and M12 (solid black). A vertical line at week 15 indicates the 'Cut off 2' point.

Settimane	M7	M8	M9	M12
0	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00	0.00
11	0.00	0.00	0.00	0.00
15	0.00	0.00	0.00	0.00
21	0.00	0.00	0.00	0.00
28	0.00	0.00	0.00	0.00
32	0.00	0.00	0.00	0.00
36	0.00	0.00	0.00	0.00
40	0.00	0.85	0.00	0.00
44	0.00	0.00	0.00	0.00

Fig. 13

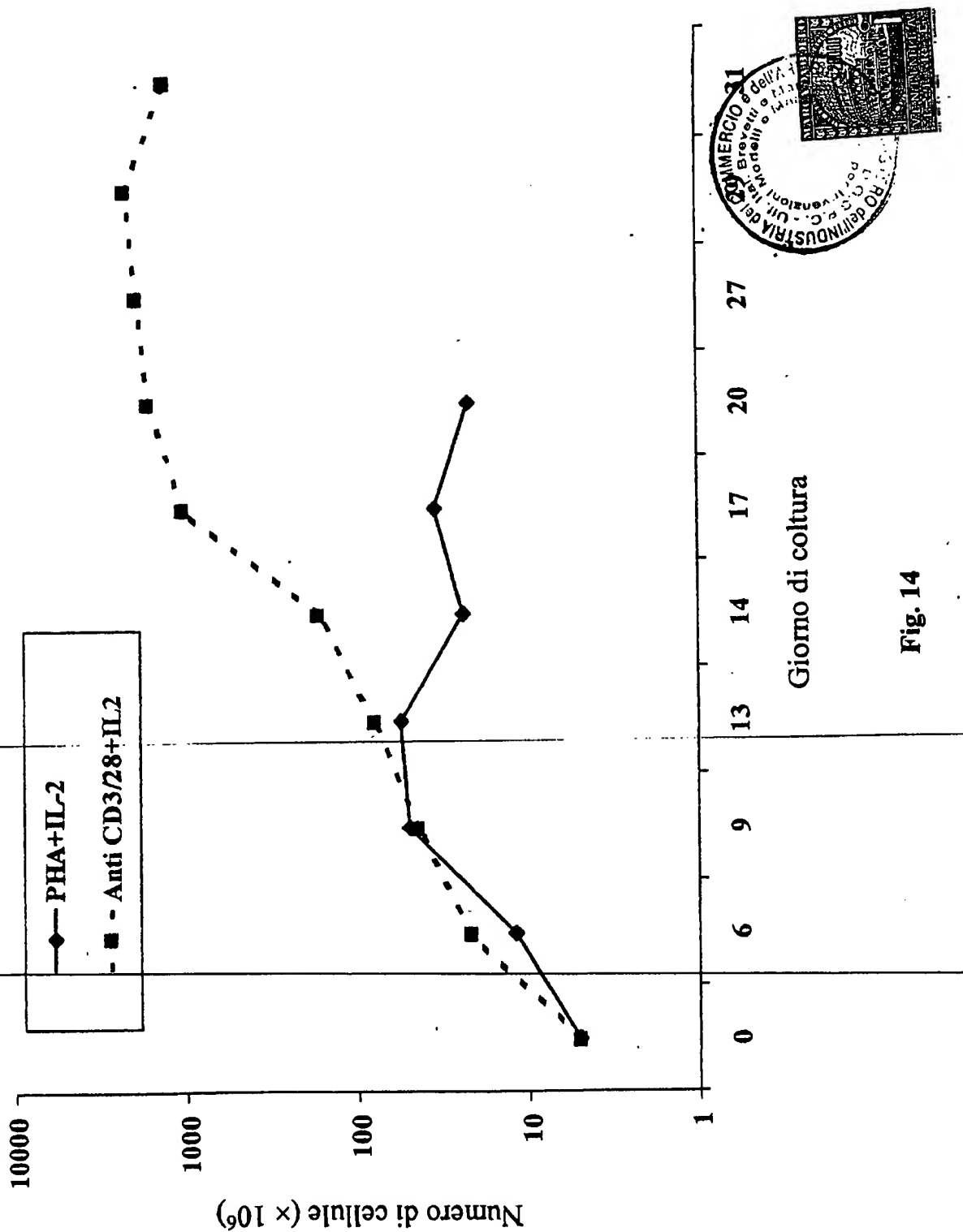
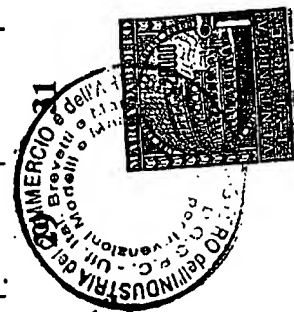
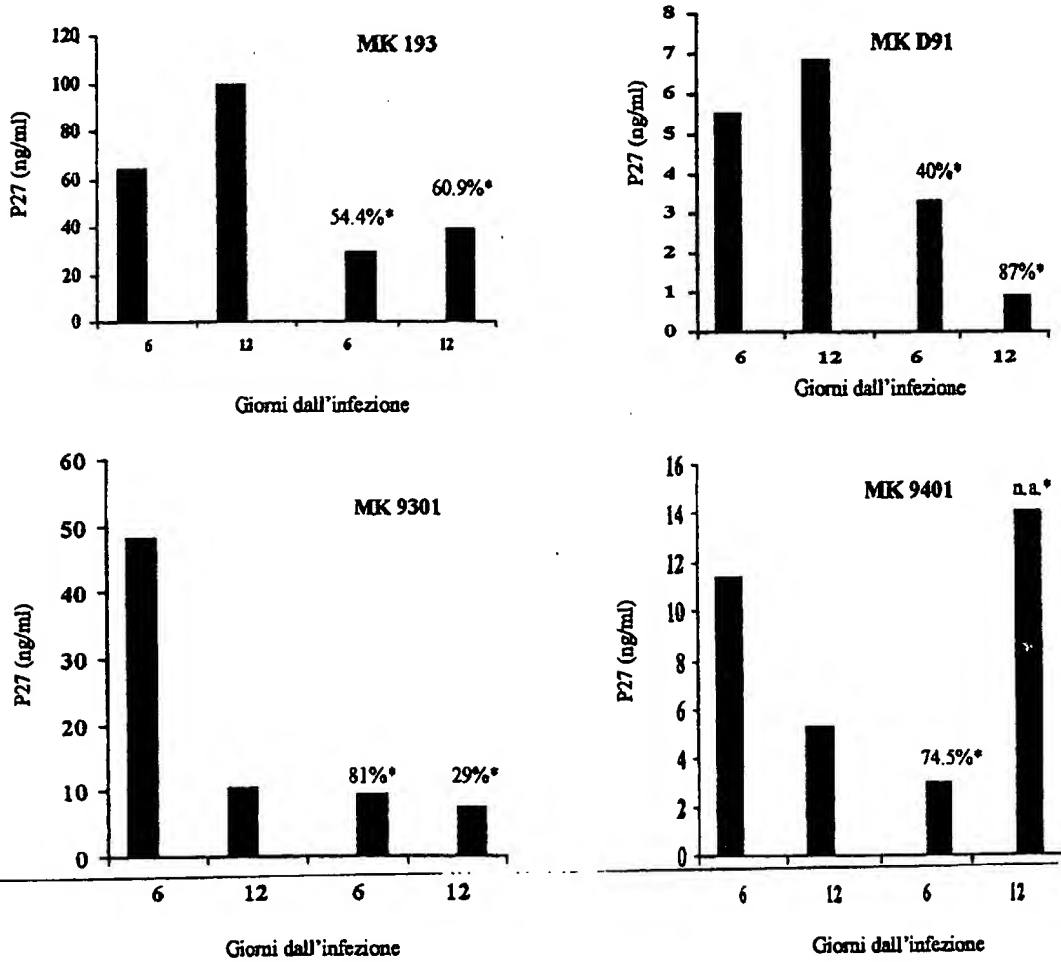


Fig. 14



1354PTIT

Tavola 15 di 16



PHA+IL-2
 Biglie anti-CD3/28 su PBMC CD8-3+28+

*: Percentuale di inibizione.

Fig. 15

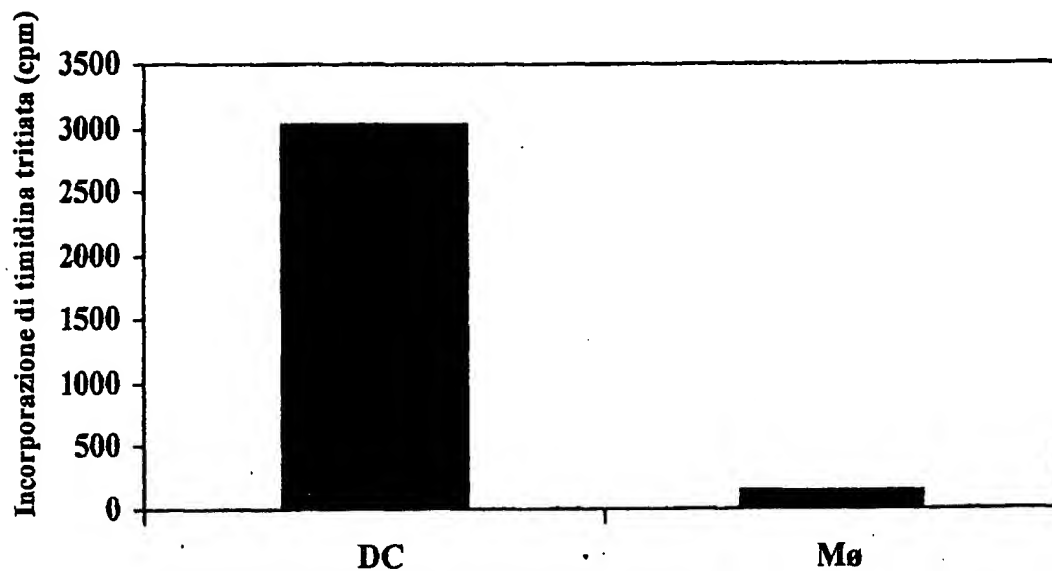
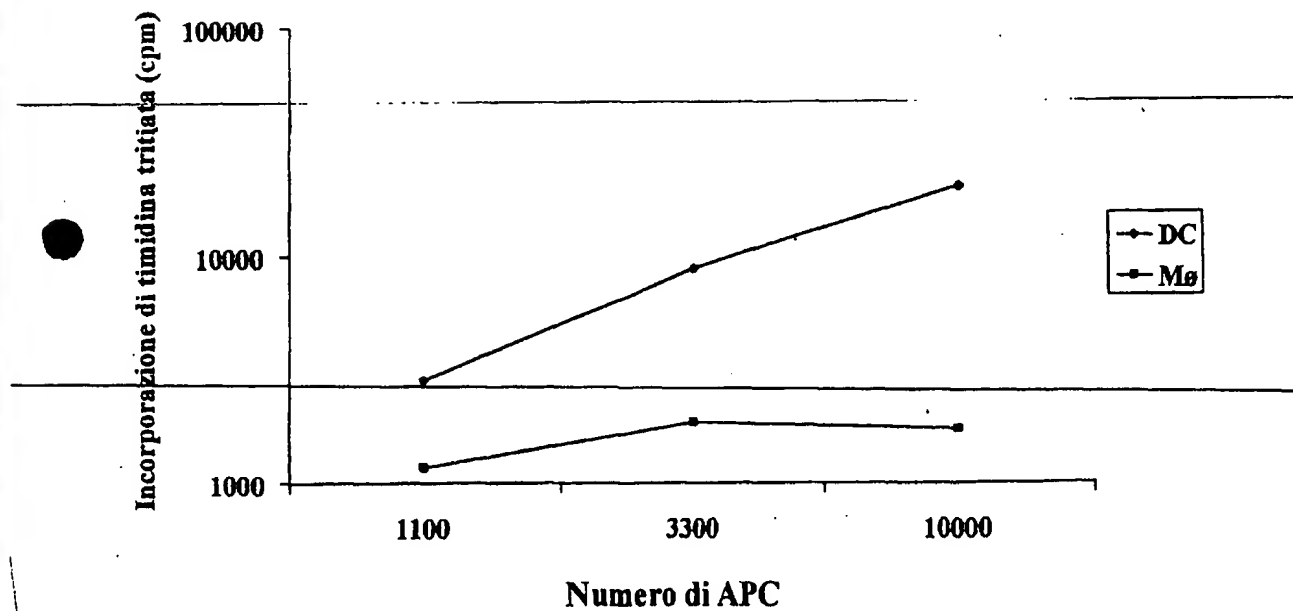
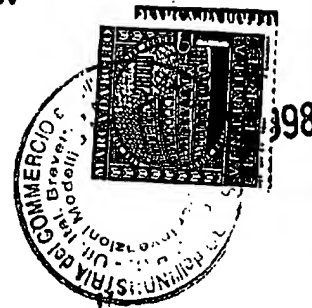
A**B**

Fig. 16

H 02.03.99



MINISTERO DELL'INDUSTRIA COMMERCIO ED ARTIGIANATO

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi - ROMA

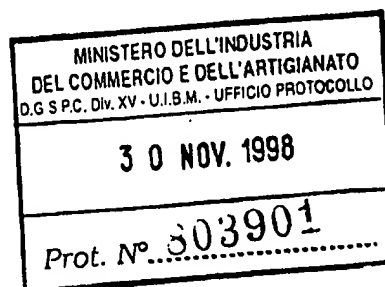
ISTANZA DI CORREZIONE FORMALE

Oggetto: Domanda di Brevetto per Invenzione Industriale n. RM97A000743 depositata il 01.12.1997 a nome Istituto Superiore di Sanità dal titolo: "Tat di HIV-1 o suoi derivati, da soli o in combinazione, a scopo vaccinale, profilattico o terapeutico, contro l'AIDS, i tumori e le sindromi associate."

In base all'Art. 49 del DPR 22.06.79 n. 338 il sottoscritto Istituto Superiore di Sanità di nazionalità italiana con sede in Roma Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma, a mezzo mandatarî Dr.ssa Gemma Gervasi (n. 238), Dr. Diego Pallini (n. 484), Dr. Giorgio Moretti (n. 206), Dr. Angelo Passini (n. 73), Ing. Giorgio Coggi (n. 148), Dr. Livio Brighenti (n. 475), Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri (n. 465), Dr.ssa R.C. Asensio (n. 504), Dr. G. Mariani (n. 329) (disgiuntamente) della NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A., Via Savoia, 82 - Roma, presso cui elegge domicilio a tutti gli effetti

di legge,

CHIEDE



H 02.03.99

che Codesto Spettabile Ufficio provveda ad apportare le seguenti correzioni come dalle seguenti postille che abbiamo riportato sul testo precedentemente integrato con nostra istanza di correzione e integrazione del 20.10.1998 protocollo n. 803745:

Postilla 1:

Pag.	Riga
26	18
29	6
30	13
31	4,21
51	18,19,20,21
55	6,7,12, e ultima riga
56	1,10
59	4
63	6
64	16
68	6,7,9,10,11
70	2,4,5,6,7,8
71	dopo Tabella 12 righe: 2,3,4,5,6,7
76	2
77	dopo Tabella 16 righe: 1,5,6,7,8,9,10
81	2
82	15
85	2
87	21
90	dopo Tabella 20 righe: 2,3,4 e penultima e ultima riga
91	dopo Tabella 22 righe: 2,3
92	penultima riga
93	dopo Tabella 24 righe: 1,6
94	9,21
95	dopo Tabella 25 righe; 1,2
97	2,3,17
98	penultima riga
103	dopo Tabella 32 riga 1
119	4

H 02.03.99

trasformare il termine "mg" in " μ g" ed il termine "ml" in " μ l".

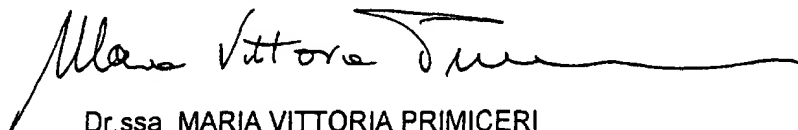
Postilla 2: Pagina 103, riga 23: sostituire "IFNa,IFNb" con "IFN α ,IFN β "

Postilla 3: Pagina 137, riga 23 e a Pagina 138, riga 5: sostituire "RGDD" con "RGDA".

Postilla 4: Pagina 44, riga 1 sostituire "CaOH" con "COOH".

Roma, 30.11.1998

Il Mandatario



Dr.ssa MARIA VITTORIA PRIMICERI

della NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

CORRECTED
VERSION*

EPO - DG 1



PCT 20.09.1999
WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : A61K 39/21, C12N 15/49, 5/10, C07K 14/16, C12N 15/86		A3	(11) International Publication Number: WO 99/27958
			(43) International Publication Date: 10 June 1999 (10.06.99)
(21) International Application Number: PCT/EP98/07721			(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) International Filing Date: 30 November 1998 (30.11.98)			
(30) Priority Data: RM97A000743 1 December 1997 (01.12.97) IT			
(71) Applicant (for all designated States except US): ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA' [IT/IT]; Viale Regina Elena, 299, I-00161 Rome (IT).			
(72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): ENSOLI, Barbara [IT/IT]; Via Pollino, 2, I-00141 Rome (IT).			
(74) Agent: GERVASI, Gemma; Notarbartolo & Gervasi S.p.A., Corso di Porta Vittoria, 9, I-20122 Milan (IT).			(88) Date of publication of the international search report: 22 July 1999 (22.07.99)
(54) Title: HIV-1 TAT, OR DERIVATIVES THEREOF FOR PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC VACCINATION			
(57) Abstract			
<p>The present invention refers to Tat as the active principale for a prophylactic and/or therapeutic vaccine against HIV infection, the progression towards AIDS and the development of tumors and other syndromes and symptoms in subjects infected by HIV. Tat is in biologically active form either as recombinant protein or peptide or as DNA. More particularly, the invention refers to a vaccine based on HIV-1 Tat as immunogen, inoculated as DNA and/or recombinant protein or as peptides, alone or in combination with other genes or viral gene products (Nef, Rev, Gag) or parts thereof, or in combination with various immuno modulant cytokines (IL-12, IL-15) or with the gene coding for an immuno modulant cytokine or part thereof. Tat, Nef, Rev, Gag and the immuno modulant cytokines are administrated both as a mixture of recombinant proteins, peptides or fusion proteins (Tat/Nef, Tat/Rev, Tat/Gag, Tat/IL-12, Tat/IL-15) or as plasmid DNA.</p>			

*(Referred to in PCT Gazette No. 36/1999, Section II)

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece	ML	Mali	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	MN	Mongolia	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MR	Mauritania	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MX	Mexico	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NL	Netherlands	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norway	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NZ	New Zealand	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	PL	Poland		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CU	Cuba	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
CZ	Czech Republic	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Germany	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
DK	Denmark	LR	Liberia	SG	Singapore		
EE	Estonia						

HIV-1 TAT, OR DERIVATIVES THEREOF FOR PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC VACCINATION

Field of the invention

The present invention refers to a prophylactic and/or therapeutic vaccine anti-HIV, anti-AIDS and against tumors and syndromes associated with HIV infection, that utilizes as immunogens wild-type or mutated proteins, peptides or DNA of HIV Tat, alone or associated with proteins, peptides or DNA of other viral products (Nef, Rev, Gag) or cytokines potentiating the antiviral immune response.

The invention refers also to the immunization with Tat or its derivatives by using autologous dendritic cells, mucosal immunization, or ex-vivo immunization of peripheral blood cells expanded by co-stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies and to the delivery of the above mentioned immunogens using erythrocytes or nanoparticles.

Background of the invention

AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) is caused by HIV (Human Immunodeficiency Virus) and is characterized by immunodeficiency, tumors, such as Kaposi's sarcoma (KS) and B-cell lymphomas, opportunistic infections and central nervous system disorders. Since AIDS is spread world-wide and has a high mortality, one of the most important Public Health goal is to develop a prophylactic and/or therapeutic vaccine against HIV or AIDS. Most of the past and current strategies have used the viral envelope or its sub-units as immunogens, but with unsatisfactory results due to the high variability of the viral envelope (ref. 162, 112 - throughout this specification, various references are referred to in parenthesis to more fully describe the state of the art to which the present invention pertains. Full bibliographic information for each citation is found at the end of the specification, immediately preceding the claims). Therefore, as an alternative to sterilizing immunity, it is a common opinion that it could be sufficient to block progression of infection and disease onset. Moreover, immuno-protective responses can be obtained utilizing DNA regions of HIV as immunogens (ref. 91, 17). Owing to the published experimental data, the inventor believes that it is necessary to produce a vaccine that utilizes viral products other than env. In

particular, the viral proteins to be used as immunogens must be more conserved among HIV isolates, capable of inducing an effective immune response, both humoral and cellular, and must have a vital function for the virus. Such products must be experimented in the model of non human primates (because their
5 immune system is more similar to that of humans as compared to phylogenetically more distant animals) and in which AIDS can develop after virus infection.

The HIV-1 Tat protein has all the characteristics to be a good immunogen for vaccine purposes: it is conserved, immunogenic and essential in the early phases of the viral infection. Moreover, Tat has a key role not only in viral replication,
10 transmission and progression of the infection, but also in the onset and progression of AIDS-associated tumors, for instance KS, which is the most frequent AIDS-associated tumor, and of other syndromes and symptoms developing after HIV infection.

Tat is a protein of 86-102 amino acids, depending on the viral strain, coded by two
15 exons. Tat is produced soon after the infection, localizes in the nucleus and transactivates the expression of all viral genes by interacting with the "Tat-responsive element" (TAR) present in the LTR (Ref. 25). Tat has also a role in HIV virulence (Ref. 63, 113, 60, 84). The product of the first exon (amino acids 1-72) is conserved among different viral isolates (Ref. 112) and is sufficient for the
20 transactivation of the HIV-1 products (Ref. 25). It contains 4 domains. The acidic domain (amino acids 1-21) is important for the Tat interaction with cellular proteins; the cysteine rich region (amino acids 22-37) represents the transactivation domain. This region is the most conserved among the primary isolates (Ref. 108) of cysteine 22 with a glycine abolishes the capacity of Tat to
25 transactivate the HIV-LTR (Ref. 166) the core domain (amino acids 38-48) is also conserved and it is important for function. Substitution of lysine 41 with a threonine inactivates the transactivating activity of Tat on the HIV LTR (Ref. 70); the basic domain (amino acids 49-57), rich in arginine and lysine, is necessary for the nuclear localization of Tat and binds specifically its RNA target (TAR) (Ref. 25).
30 Moreover, the basic region is responsible for the binding of extracellular Tat to heparin and to heparansulphate proteoglycans (HSPG) (Ref. 26). Mutations in the

basic region abolish such interactions. The carboxy-terminal portion of Tat is not necessary for the LTR transactivation, but contains an arginine-glycine-aspartic acid sequence (RGD), usually present in the extracellular matrix proteins (ECM), that is responsible for the binding of Tat to the integrin receptors $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$.

5 These interactions mediate the Tat effects on AIDS-associated tumors and on the immune, vascular and nervous system (Ref. 11, 42, 170, 25). During the acute infection of T-cells with HIV-1, or after transfection of the *tat* gene in COS-1 cells, the Tat protein is released in the absence of cellular death in the extracellular environment (Ref. 40, 41, 25). Tat release from infected cells occurs also *in vivo*
10 since extracellular Tat is present in the serum of infected subjects (Ref. 164) and in AIDS-KS lesions (Ref. 42). After release, part of the protein remains in a soluble form, and part binds to the HSPG of the ECM. Tat bound to the HSPG can be recovered in a soluble form by the addition of heparin. The binding with heparin is due to the Tat basic region; it prevents the effects of extracellular Tat and protects
15 the protein from oxidation. This feature has been used by us to purify Tat with a high biological activity (Ref. 26). Extracellular Tat can be internalized by cells, can migrate into the nucleus and transactivate viral gene expression (Ref. 49, 98, 100, 41). The internalization of Tat occurs by endocytosis mediated by the binding of RGD region of Tat to $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ (Ref.10, 42, Ensoli et al., unpublished data)
20 and/or by the basic region which binds to HSPG.

Tat can activate viral replication and virus transmission also through indirect mechanisms involving the modulation of the expression of cellular genes which play a key role in the control of cell survival, and on the expression of inflammatory cytokines (IC) with an effect on viral replication (Ref. 25).

25 Beyond its importance in viral replication, Tat plays an important role in AIDS pathogenesis. Tat is able to modulate the survival and proliferation of infected and non-infected cells by causing activation or repression of cytokines, such as IL-2 (Ref. 123, 163, 31), or of genes with a key role in the cell cycle (Ref. 145, 169, 164, 173). The anti- or pro-apoptotic effects of Tat depend on a number of factors
30 such as the cell type, the fact that Tat is expressed by the cell or added to the cell and on its concentration (Ref. 40, 41, 171).

Tat is the factor responsible for the enhanced frequency and aggressiveness of KS in HIV-1 infected subjects (Ref. 43, 33). KS is a tumor of vascular origin and it is the most frequent neoplasia in HIV-infected individuals. Tat induces KS cells and endothelial cells activated by IC to migrate, to express type IV collagenase, to
5 invade the ECM and to proliferate, such mechanisms being necessary for angiogenesis and tumor invasion (Ref. 40,41, 42, 2, 46). Such effects of Tat are induced by IC, since they stimulate the expression of the Tat receptors, $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ (Ref. 10). Tat mimics the effect of ECM proteins, such as fibronectin and vitronectin and both the RGD region and the basic region are necessary for the
10 effects of the extracellular Tat on KS cells, on angiogenesis and on progression of KS. The capability of extracellular Tat of binding in vivo its receptors in the AIDS-KS lesions (Ref. 40) support the idea that Tat is involved in the onset and the maintenance of AIDS-associated KS. Moreover mice transgenic for the tat gene develop KS or other phenotypes depending on the level of expression of the
15 transgene (Ref. 160, 34).

It has been suggested that Tat plays a role in the hyperproliferative phenomena and in the pathogenesis of the B lymphomas, frequently observed in seropositive subjects and in tat-transgenic mice (Ref. 157), through mechanisms involving the enhancement of bcl-2 and cytokines expression (Ref. 122). Other evidence
20 confirms a probable role of Tat in oncogenesis (Ref. 72).

Tat can also activate the expression of viral promoters, such as those of herpesviruses and of other viruses which reactivate in AIDS individuals, promoting the onset and progression of opportunistic infections (Ref. 25).

Tat seems also able to exert neurotoxic effects both direct (through the basic and
25 the RGD regions) and indirect through induction of IC having a toxic effect on the neurons of the central nervous system or on the hematoencephalic barrier (Ref. 25). Regarding the immune response to Tat, a number of studies suggest that anti-Tat antibodies play a protective role in the control of the evolution of the disease in vivo (Ref. 130, 135, 136, 149, 127). Moreover, in vitro, anti-Tat antibodies not only
30 suppress the internalization, the transcellular activation of Tat and viral infection (Ref. 41, 127), but they also inhibit the proliferation and Tat-induced migration of

KS cells and the formation of KS-like lesions in mice (Ref. 40, 41, 42). Finally, our preliminary results demonstrate that anti-Tat antibodies are absent in AIDS-KS subjects, suggesting that such subjects cannot block the activity of extracellular Tat.

- 5 The development of an anti-Tat cell-mediated response in the initial phase of infection is important for the control of the infection itself (Ref. 161, 133, 59) and there exists an inverse correlation between the presence of specific anti-Tat CTL and disease progression (Ref. 156). Such results were obtained in studies on macaques inoculated with SIVmac (Ref. 91, 158). Moreover, recent data in mice
10 of different species in which Tat was inoculated either as a plasmid or as protein showed that it is possible to induce both a humoral and cellular response to the protein (Ref. 61). However, it has been observed variability among several mouse species and such results have not been reproduced with the same immunogens in non-human primates (Ref. 124). The lack of reproducibility in non
15 human primate model of the results from vaccine experiments performed in mice is frequent and possibly due to the different immune system of these two species which can raise different immune responses with the same immunogen, as demonstrated for the HIV Env protein. Thus, candidate vaccines for humans must be tested in non-human primates and not only in inferior species.
- 20 The inventor believes that other viral proteins, or parts thereof, could be associated with Tat to enhance a specific immune response against HIV and could be of benefit also in the vaccination against the onset of tumors and of other pathologies and symptoms associated with HIV infection. Such products are the Nef, Rev and Gag proteins of HIV.
- 25 Nef is another viral regulatory protein important for the development of disease (Ref.3, 48, 58). Nef is produced early after infection and it is released in the extracellular environment (Ensoli, unpublished data). In the SIVmac/maaque system the presence of Nef correlates with high viral replication and with progression to AIDS (Ref. 71). Nef is more variable than Tat (Ref. 112). Nef is an
30 immunogenic protein (Ref. 53, 32, 35, 151) and it is capable of inducing CTL (Ref. 16, 36). In particular, it has been identified an immunodominant region of Nef

(region 73-144) which is recognized by CTLs in most HIV-infected patients.

Rev is a viral regulatory protein produced early during infection (Ref. 51, 119) and released in the extracellular environment (Ensoli et al., unpublished data). Rev is essential for HIV replication and for disease progression, and is coded by two exons, partially overlapping Tat-coding regions. Rev is a nuclear protein (Ref. 44) necessary for the expression of the viral messenger RNAs coding for the late proteins (Ref. 97). Rev is a highly conserved protein among the various viral isolates of HIV-1 (Ref. 111) and it is immunogenic. In fact, it induces the production of specific antibodies directed against the two functional domains of the protein (Ref. 120) during the natural infection in man (Ref. 131) and after inoculation in mice (Ref. 61). Lower levels of anti-Rev antibodies in the sera of infected individuals seem to correlate with the progression to AIDS (Ref. 131). Rev can induce CTL both in man and in monkey (Ref. 156, 158) and it has been reported that a specific anti-Rev CTL response, early during the infection, is inversely correlated with disease progression (Ref. 156, 158).

Another viral target is the gag gene, which is expressed late during infection and codes for a group of highly immunogenic structural proteins of the capsid (Ref. 18, 147). The anti-Gag antibody titers are high and stable during the asymptomatic phase of infection, and reach very low levels when the infection progresses to full-blown AIDS, in combination with the drop of CD4⁺ lymphocytes and the presence of the virus in the peripheral blood (Ref. 174, 73). Gag proteins induce CTL activity early during infection, both in man and in primates (Ref. 103, 168), and their presence is significantly related with the control of the initial viremia and with disease progression (Ref. 175, 6,134, 167, 92). Finally, p17 and p24 proteins contain immunodominant epitopes which are maintained in different HIV-1 and HIV-2 isolates and are recognized by CTL (Ref. 89, 19, 114, 155, 115).

The inventor believes that cytokines or parts thereof, such as IL-12 and IL-15, or other immuno modulant cytokines such as IFN α or IFN β or other proteins enhancing the immunogenic effect of Tat, can be utilized as adjuvants in the formulation of the anti-Tat vaccine. IL-12 is a strong immunoregulatory cytokine produced by antigen-presenting cells (APC) such as B and dendritic cells (Ref.

154). IL-12 is produced early after HIV infection and has a pro-inflammatory action inducing NK cells and T-lymphocytes to produce IFN γ which activates phagocytes and promotes the induction of Th1 lymphocytes. IL-12 plays a fundamental role in the resistance to a number of infections caused by bacteria, fungi, viruses and
5 shows a high anti-tumor activity. Several evidences suggest that viruses which induce immunosuppression, such as HIV and measles virus, act also through mechanisms which suppress IL-12 production (Ref. 57, 50, 144).

IL-15 is a pleiotropic cytokine expressed by non-lymphoid tissues, by activated monocytes/macrophages and by dendritic cells (DC) (Ref. 125, 66). IL-15 plays an
10 important role in regulating the NK activity, in the proliferation of T lymphocytes and in the CTL activity (Ref. 67, 24). IL-15 induces the expression of CTLs against HIV antigens, in the absence of IL-2 and functional CD4 $^{+}$ T-lymphocytes (Ref. 68, 1). Moreover, similarly to IL-2, IL-15 induces the expansion of lymphocytes with cytotoxic activity ("lymphokine-activated killer", LAK) and stimulates production of
15 IFN γ in PBMCs of seropositive patients (Ref. 93). IL-15 activates monocytes to produce chemokines, playing a role in the onset of inflammatory processes (Ref. 8).

Recent studies have shown that the co-stimulation of CD4 $^{+}$ lymphocytes with paramagnetic beads, coated with anti-CD3 e anti-CD28 monoclonal antibodies
20 determines a logarithmic and polyclonal expansion of lymphocytes from HIV-infected subjects (Ref. 82) without activating virus replication and transmission. Such antiviral activity is a consequence of both the negative modulation of the expression of CCR5, the co-receptor of HIV-1 monocyctotropic strains (Ref. 23) and, to a lesser extent, of the high levels of chemokines induced by the co-
25 stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies (Ref. 132). The inventor believes that the possibility to expand autologous lymphocytes from HIV infected subjects in the absence of viral replication/transmission, permits to obtain an effective ex vivo immunization, described in the examples, which can be highly helpful in developing an anti-Tat vaccine.

30 Within the different systems aimed at the generation of effective antiviral and anti-tumor vaccines, the inventor believes that the utilization of dendritic cells could be

key in the induction of an immune response to Tat. This is due to the fact that these cells are the most efficient in presenting the antigen and the sole able to stimulate naive lymphocytes, in the absence of adjuvants (Ref. 150). The use of dendritic cells replaces the function of several adjuvants consisting in the induction
5 of a non specific immune response (natural immunity) which, in turns, generates a strong primary specific response in the presence of the antigen.

Since the transmission of HIV infection primarily occurs at the mucosal level (genital and rectal in the adult, oral in the new-born), the inventor believes that the induction of protective immunity at the mucosal level is a primary
10 goal. Many studies have recently shown the possibility to induce mucosal immunization, local and systemic. Particularly, the nasal and oral routes have shown to be the most efficient in inducing an effective mucosal immune response, even at distant sites, such as the genital mucosa (Ref. 138, 118). In particular, the inventor believes that the use of *S. Gordonii* and *Lactobacillus* bacteria, modified
15 to express the above mentioned viral antigens, might be a valid strategy to induce or potentiate a specific immune response at the mucosa level in monkeys and in man. These bacteria are, in fact, able to colonize the mouse oral and vaginal mucosa, and to induce a specific, local and systemic, antibody response against heterologous antigens expressed on the surface of recombinant bacteria (Ref.
20 116, 104, 106, 121, 117, 139, 105, 107). Finally, these bacteria act as live vectors and can induce a prolonged stimulation of the immune system. Moreover, the inventor believes that non-replicating and non-pathogenic recombinant viral vectors, such as herpes simplex type-1 viruses (HSV-1) (Ref. 99), can be used to express viral proteins for systemic (intradermic) and mucosal (oral, vaginal and
25 nasal routes) immunization. In fact, these vectors can accommodate large exogenous sequences (Ref. 52, 64), such as several HIV genes (regulatory, accessory and structural). Moreover, herpes vectors can also be administered via the oral, nasal or vaginal route (Ref. 176, 75).

The inventor believes that Tat (either as protein or DNA), alone or in combination
30 with the other immunogens described above, can be inoculated also by using new delivery systems, such as erythrocytes or nanoparticles. In particular, the inventor

believes that it is possible to deliver antigens bound to the membrane of autologous erythrocytes (Ref. 95, 96). Since these erythrocytes are removed from the blood by macrophages, professional antigen presenting cells, only after 120 days, this feature can be used for vaccine purposes. Finally, another delivery
5 strategy is the use of nanoparticles that can carry proteins and DNA (Ref. 27, 172). Nanospheres are polymeric colloidal particles of diverse chemical composition, variable from 10-1000 nm. Different substances (oligonucleotides, drugs, proteins, peptides, DNA) can be loaded on their surface or absorbed in the particle and delivered into the cytoplasm or the nucleus of the cells from where
10 they are slowly released. This allows the utilization of very small amounts of the substance to be delivered.

Based on the results described above, the inventor believes that the immunization with Tat, alone or in combination with other viral products or immuno modulant cytokines, or parts thereof, in the presence or not of adjuvants, could block viral
15 replication in subjects exposed after vaccination and in the infected subjects, maintaining the infection in an abortive phase, which can be more easily controlled by the immune system. Therefore, the inventor believes that a Tat-based vaccine should be able to induce an immune response, both humoral and cellular, sufficient to block or reduce the replication or the transmission of the virus and
20 therefore capable of controlling virus replication and of blocking productive infection, progression to disease and the onset of tumors and other AIDS-associated syndromes and symptoms. It is, therefore, possible to use the anti-Tat vaccine for both preventive and therapeutic purposes. In fact, a humoral response against Tat could neutralize the effects of extracellular Tat reducing and limiting
25 the infection, whereas the cell-induced response against Tat as well as against other viral proteins enclosed in the vaccine formulation, could destroy the virus infected cells leading to the control the infection. This allows the necessary period of time to the immune system for developing a complete response towards all viral components of the infecting virus in the absence of irreversible damages due to
30 viral replication.

It has been described the use of Tat as an immunogen (WO 95/31999). However,

it is disclosed the use of a biologically inactive protein; moreover, in the same patent application no evidence is shown of the biological activity of the "native" Tat protein.

In addition, there is a strong technical prejudice against the use of a biologically active Tat protein, in that it is believed to enhance viral replication in infected subjects and/or to give immunosuppression in seronegative or seropositive individuals (A.Tonelli: Aids, un vaccino per sperare. "La Repubblica", pag. 10, 24 Oct. 1998)

As evident from the above, despite the efforts made, an efficacious anti-HIV vaccine based on Tat has not been developed yet.

Summary of the invention

It is an object of the present invention a Tat protein or peptides of Tat or the Tat DNA for use as a vaccine, being intended that Tat must be in its biologically active form.

Another object of the invention is a protein or a peptide vaccine to be used in humans, prophylactic or therapeutic against AIDS, AIDS-associated tumors and HIV-associated syndromes and symptoms and comprised of recombinant wild-type Tat protein or its mutants (Seq. 1-5), expressed and purified as described, or wild-type or mutated Tat peptides (Seq. 1-7), administered alone or conjugated with T-helper tetanus toxoid epitope or other T-helper epitopes.

Another object of the invention is a vaccine as described above, in combination with recombinant HIV Nef, Rev and/or Gag proteins or peptides of Nef, Rev and Gag administered as Tat/Nef, Tat/Rev, Tat/Gag fusion proteins or as parts of these proteins.

Another object of the invention is a vaccine as described above, in combination with recombinant proteins of immuno modulant cytokines like IL-12, IL-15 or others molecules or part of these, capable of increasing the antiviral immune response, or a vaccine constituted by Tat/IL-12, Tat/IL-15 or Tat/other fusion proteins, or part of these, capable of increasing the antiviral immune response.

Another object of the invention is a DNA vaccine, to be administered in humans, prophylactic or therapeutic, against AIDS, AIDS-associated tumors and HIV-

related syndromes and symptoms, constituted by vectors coding for wild-type Tat or its mutants (Seq. 1-5), or part of these, inserted in the expression plasmid vector pCV0 or other vectors.

Another object of the invention is a DNA vaccine, as described in 4, in
5 combination with HIV rev, nef or gag genes, or part of these, inserted in the pCV0 vector, or a DNA vaccine administered as a vector co-expressing tat/rev, tat/nef, tat/gag genes or part of these.

Another object of the invention is a DNA vaccine as described above, in combination with the DNA coding for IL-12 and IL-15 or other genes coding for
10 immuno modulant cytokines or part of these, inserted in pCV0 or other vectors, or a DNA vaccine administered as a vector co-expressing Tat/IL-12, Tat/IL-15 or Tat/other molecules, or part of these, capable of increasing the anti-viral immune response.

Another object of the invention is an anti-Tat vaccine, as a protein, peptide and/or
15 DNA, alone or combined as described above for immunization with autologous dendritic cells by *ex vivo* treatment.

Another object of the invention is an anti-Tat vaccine as a protein, peptide and/or DNA, alone or combined as described above, for mucosal immunization (nasal, oral, vaginal or rectal).

20 Another object of the invention is an anti-Tat vaccine as a protein, peptide and/or DNA, alone or combined as described above, for ex vivo immunization of peripheral blood cells from infected subjects expanded through co-stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies conjugated to paramagnetic beads and re-infused in the host.

25 Another object of the invention is an anti-Tat vaccine, as a protein, peptide and/or DNA as described above, combined with inhibitors of viral replication.

Another object of the invention is an anti-Tat vaccine as already described, in combination with adjuvants which increase the immune response.

Another object of the invention is an anti-Tat vaccine, alone or in combination as
30 already described, administered by specific delivery systems, such as nanoparticles, herpes vectors, red blood cells, bacteria or any other delivery

system by which the above described vaccine, in all its combinations, can be administered.

Further objects will be evident from the detailed description of the invention.

Brief description of the figures

- 5 **FIG. 1A.** Inhibition of uptake of 10 ng/ml rhodaminated Tat protein by pre-incubation of cytokine-activated endothelial cells with anti-integrin antibodies.

FIG. 1A. Panel A, cells pre-incubated with buffer, incubated with BSA.

FIG. 1A. Panel B, cells pre-incubated with buffer, incubated with Tat.

- FIG. 1A. Panel C,** cells pre-incubated with monoclonal antibodies CDw49e and
10 CD29, incubated with Tat.

FIG. 1A. Panel D, cells pre-incubated with monoclonal antibodies CD51 and CD61, incubated with Tat.

FIG. 1A. Panel E, cells pre-incubated with anti-human factor VIII antibodies (control antibodies), incubated with Tat.

- 15 **FIG. 1B.** Capability of purified Tat-cys22 (Tat22) protein to compete the transactivating activity of wild type Tat protein monitored by cat assays.

- FIG. 2A.** Anti-Tat specific IgG production in monkeys vaccinated with the Tat protein, determined by immuno-enzymatic assay (ELISA). Results obtained in two monkeys inoculated sub-cute with 10 or 100 µg of recombinant Tat protein re-
20 suspended in 250 µl of autologous serum and 250 µl of RIBI.

FIG. 2B. Anti-Tat specific IgG production in monkeys vaccinated with the Tat protein, determined by immuno-enzymatic assay (ELISA). Results for the control monkey (M3).

- FIG. 3.** Titration of anti-Tat antibodies in plasma from monkeys inoculated with
25 100 (M1) and 10 (M2) µg recombinant Tat protein, described in Fig. 2A and Fig. 2B.

- FIG. 4A.** Mapping of the Tat epitopes recognized by the anti-Tat IgG from monkeys injected with 100 (M1) and 10 (M2) µg of recombinant Tat protein, described in fig. 2A and Fig. 2B. The average results of plasma diluted 1:50 for
30 each peptide tested in duplicate are shown.

FIG. 4B. Mapping according to Fig. 4A. The antibody titers in plasma are shown, expressed as the reciprocal of the highest dilution at which the test was still positive.

FIG. 5. Analysis of the specific anti-Tat humoral IgM response in monkeys inoculated with Tat protein determined by ELISA.

FIG. 6. Analysis of specific anti-Tat IgG production in monkeys inoculated with Tat protein, tested by ELISA.

FIG. 7. Titration of anti-Tat antibodies in plasma from the monkeys inoculated with recombinant Tat (10 µg) in the presence of RIBI (M1-3) or Alum (M4-6) described in Figure 6.

FIG. 8A. Epitopes of Tat recognized by anti-Tat IgG from monkeys inoculated as described in figure 6. The results refer to samples diluted 1:50 and are the average from duplicate wells.

FIG. 8B. Epitopes of Tat according to Fig. 8A. The results refer to the titration of plasma shown in Fig. 8A and are expressed as the highest reciprocal dilution of plasma at which the test was still positive.

FIG. 9. Analysis of Tat specific CTL.

FIG. 10. Analysis of the response of delayed hypersensitivity to Tat by skin test.

FIG. 11A. Humoral IgG response to Tat in monkeys vaccinated with Tat DNA. There are shown the results obtained from two monkeys vaccinated with 200 (M1) and 500 (M2) µg of pCV-Tat plasmid.

FIG. 11B. Humoral IgG response to Tat in monkeys vaccinated with Tat DNA. Results for the control monkey (M3).

FIG. 12. Titration of anti-Tat antibodies in plasma from monkey M2 inoculated i.d. with 200 µg of pCV-Tat.

FIG. 13. Analysis of anti-Tat IgG production in three monkeys (M9 to M11) inoculated with 1 mg of pCV-Tat and in one control monkey (M12), inoculated with 1 mg of control vector pCV-0.

FIG. 14. Kinetics of the proliferative response of PBMC from *Macaca fascicularis* to the co-stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies on paramagnetic beads (anti-CD3/28 beads).

FIG. 15A. Antiviral effect of the co-stimulation with anti-CD3/28 beads on PBMC of *Macaca fascicularis*. Monkey MK 193.

FIG. 15B. Antiviral effect of the co-stimulation with anti-CD3/28 beads on PBMC of *Macaca fascicularis*. Monkey MK D91.

5 **FIG. 15C.** Antiviral effect of the co-stimulation with anti-CD3/28 beads on PBMC of *Macaca fascicularis*. Monkey MK 9301.

FIG. 15D. Antiviral effect of the co-stimulation with anti-CD3/28 beads on PBMC of *Macaca fascicularis*. Monkey MK 9401.

10 **FIG. 16A.** Functional characterization of dendritic cells (DC) obtained from monkey's peripheral blood. ³H-Thymidine incorporation at day 4 of allogeneic mixed leukocyte culture (AMLR).

FIG. 16B. Functional characterization of dendritic cells obtained from monkey's peripheral blood. APCs, such as DC and Mø, obtained as reported in figure 16A, were challenged with T lymphocytes from another monkey.

15 **Detailed description of the invention**

The present invention refers to Tat as the active principle for a prophylactic and/or therapeutic vaccine against HIV infection, the progression towards AIDS and the development of tumors and other syndromes and symptoms in subjects infected by HIV. Tat, or wild-type Tat, is in its active form or, more correctly, in its
20 biologically active form (as explained herein below) either as recombinant protein or peptide or as DNA. More particularly, the invention refers to a vaccine based on HIV-1 Tat as immunogen, inoculated as DNA and/or recombinant protein or as peptides, alone or in combination with other genes or viral gene products (Nef, Rev, Gag) or parts thereof, or in combination with various immuno modulant
25 cytokines (IL-12, IL-15) or with the gene coding for an immuno modulant cytokine or part thereof. Tat, Nef, Rev, Gag and the immuno modulant cytokines are administrated both as a mixture of recombinant proteins, peptides or fusion proteins (Tat/Nef, Tat/Rev, Tat/Gag, Tat/IL-12, Tat/IL-15) or as plasmid DNA.

In the present description "wild-type Tat" and "Tat in its active form" have to be
30 considered synonymous of "biologically active Tat".

According to the present invention, as "biologically active Tat" it is intended the

protein that, at picomolar to nanomolar concentrations (from 10 ng/ml or less to 1 µg/ml, preferably 0.1 ng/ml to 100 ng/ml) is capable of:

- (i) entering and localizing in the nuclei of activated endothelial cells or dendritic cells, as measured in Example 1A;
- 5 (ii) activating the proliferation, migration and invasion of Kaposi's sarcoma (KS) cells and cytokine-activated endothelial cells protein (Ref. 40, 2);
- (iii) activating virus replication when added to infected cells as measured a) by the rescue of Tat-defective proviruses in HLM-1 cells after the addition of exogenous protein (Ref. 41); b) by the transactivation of HIV-1 gene expression in cells
- 10 transfected with a HIV-1 promoter-reporter plasmid protein (Ref. 41);
- (iv) inducing in mice the development of KS-like lesions in the presence of angiogenic factors or inflammatory cytokines (Ref. 42).

The inventor considers to be fundamental for biologically active Tat that one of the points (i) or (ii) be verified, preferably both should be verified, more preferably

15 point (i) or point (ii) or both in combination with point (iii)a) and/or (iii)b) should be verified. The best results will be obtained when all (i) to (iv) points are verified. A Tat protein or fragments of Tat with these characteristics are capable of inducing *in vivo* a cytotoxic and antiviral immune response. In fact, a biologically active Tat with the characteristics mentioned above is capable of binding specific cell surface

20 receptors and is taken up via these receptors. Tat uptake is essential for inducing a cytotoxic response.

Previous or ongoing studies, related to the development of a vaccine based on Tat, have not utilized a biologically active Tat protein with the characteristics mentioned above.

25 A method to obtain and to handle a biologically active Tat according to the present invention is described in Example 1.

It is also described an immunization method utilizing autologous dendritic cells treated *ex vivo* with recombinant Tat protein, or peptides thereof, alone or with a mixture of recombinant proteins or peptides (Tat, Nef, Rev, Gag) or with the Tat

30 protein and one or more immuno modulant cytokines, or parts thereof, or transduced with eukariotic vectors containing the *tat* gene alone or in combination

with viral genes coding for Nef, Gag or Rev, or tat and the gene coding for an immuno modulant cytokine or part thereof.

Strategies to induce an immune response at the mucosal level are also described. Tat or its peptides, alone or in combination with viral proteins and/or cytokines is inoculated at the mucosal level to enhance and induce the local immune response. The HIV-1 Tat protein or sub-units thereof will also be utilized for the *ex vivo* immunization of CD4+ and CD8+ lymphocytes isolated from the peripheral blood of infected subjects. The Tat antigen specific cells will be then expanded *in vitro* through co-stimulation with monoclonal antibodies directed against CD3 and CD28 and re-infused. Finally, it is also described the use of Tat mutants, identified in the examples, to be utilized as immunogens, as an alternative to Tat wild type. The Tat mutants are i) in the cysteine region (cys22) and ii) in the core region (lys41), iii) the mutant deleted in the RGD sequence; iv) the double mutant deleted at lysine 41 and the RGD. Alternatively to the use of Tat mutants or Tat peptides (wild type or mutated as the protein) in case of therapeutic vaccination, inhibitors of viral replication will be utilized along with the immunogen.

In this regard, for "inibitors of viral replication" it is intended all molecules known at the present, or those which will be discovered later on (nucleoside and non-nucleoside inhibitors of reverse transcriptase, protease inhibitors, antisense RNA and, in general, all molecules able to block HIV gene expression) able to reduce or block the HIV replication. As previously said, different methods of immunization are described, which utilize Tat ptoein, peptides and Tat DNA in association with other viral genes or proteins, or part thereof, or immuno modulant cytokines or genes coding for immuno modulant cytokines, or part thereof. For "part thereof" it is intended segments of genes or of proteins, above described, whose efficacy of inducing the same immunogenic effects of the entire gene or protein is demonstrated. Moreover, since the efficacy of adjuvants in vaccine strategies is known, the present invention refers to the use of known adjuvants and of those which will be discovered later on, administered together with Tat (protein or DNA) and with combinations of Tat and other genes or viral or cellular proteins. Similarly, it is hypothesized the efficacy of different delivery systems of Tat (protein

or DNA) and combinations of Tat and other genes or viral or cellular proteins in inducing both a systemic and local immune response to Tat (mucosal immunization).

Results obtained from the inventor (not published), indicate that only the Tat protein, in its biologically active form, is able to bind specific cellular receptors and enter the cell. This characteristic is at the base of the immune response of accessory cells and of the immune cells more in general and, according to the inventor, it is of a fundamental importance in inducing a much stronger immune response than the inactivated protein is able to elicit. In conclusion, unlike the use of inactivated Tat as immunogen, proposed by some scientists, the inventor intends to utilize HIV-1 Tat, or its mutants, in its biologically active form, in order to induce a very strong immune response against HIV, able to prevent infection or the development of the disease and to permit efficient therapeutic strategies in HIV-1-infected individuals. According to the inventor, the vaccine can be delivered through systemic (intramuscular, i.d., subcute, etc.) or local (mucosal) routes. The last route is preferred when bacteria (see below) are utilized as delivery systems.

The vaccine can be produced as follows. Tat can be prepared according to Example 1, it can be lyophilized and stored. At the moment of use, it can be resuspended in a biologically acceptable fluid, such as serum, plasma, or their fractions.

Transformed cells, comprising a Tat-expressing vector, or Tat mutant-expressing vector, or parts thereof, as previously described, and cells which are cultured to express Tat protein, which will be isolated for the use, are all included in the scope of the present patent.

It is intended that all Tat variants (including all types and subtypes of HIV strains), with analogous or greater activity than that above described, are included in this invention.

The present invention will be now described by means of its illustrative and not restrictive specific examples, in which reference will be made to the enclosed figures.

Detailed description of the figures

FIG. 1A. Inhibition of uptake of 10 ng/ml rhodaminated Tat protein by pre-incubation of cytokine-activated endothelial cells with anti-integrin antibodies. Cytokine-activated human umbilical vein (HUVE) cells, treated as described in the legend to Table 2A, were pre-incubated in serum free medium containing buffer or antibodies and then incubated for 15 minutes at 37°C with 10 ng/ml rhodaminated Tat or rhodaminated BSA.

Panel A, cells pre-incubated with buffer, incubated with BSA.

Panel B, cells pre-incubated with buffer, incubated with Tat.

Panel C, cells pre-incubated with the monoclonal antibodies CDw49e (anti- $\alpha 5$) and CD29 (anti- $\beta 1$), incubated with Tat.

Panel D, cells pre-incubated with the monoclonal antibodies CD51 (anti- αv) and CD61 (anti- $\beta 3$), incubated with Tat.

Panel E, cells pre-incubated with anti-human factor VIII antibodies (control antibodies), incubated with Tat.

FIG. 1B. Shown is the capability of purified Tat-cys22 (Tat22) protein to compete the transactivating activity of wild type Tat protein monitored by cat assays. H3T1 cells, containing the HIV-1 LTR-CAT reporter gene (Ref. 148), were incubated with wild type Tat protein (100 ng), alone or in the presence of a molar excess of Tat-cys22 protein (1 μ g). The HIV-1 LTR transactivating activity of Tat and the capability of the Tat-cys22 protein of competing with wild type Tat have been determined at 48 h after transfection by determining the cat activity in cytoplasmic extracts (corresponding to 200 μ g of protein), as described (Ref. 41). The percentages (%) in acetylation of 14 C-chloramphenicol are indicated.

FIG. 2 . Anti-Tat specific IgG production in monkeys vaccinated with the Tat protein, determined by immuno-enzymatic assay (ELISA). (A) shows the results obtained in two monkeys inoculated subcutaneous with 10 or 100 μ g of recombinant Tat protein re-suspended in 250 μ l of autologous serum and 250 μ l of RIBI; (B) shows the results for the control monkey (M3). Monkeys were inoculated at time 0 and after 2, 5, 10, 15, 22, 27, 32 and 37 weeks. Anti-Tat antibodies were evaluated also at week 41 in monkey M2, inoculated with 10 μ g of Tat protein, and for monkey M3.

The presence of the anti-Tat antibodies in the plasma of the vaccinated animals was evaluated by ELISA prepared and characterized as follows. The Tat protein was adsorbed in PVC- 96-well plates (100 ng/well in 200 μ l carbonate buffer 0.05 M pH 9.6) for 12 h at 4°C. After 3 washings with PBS 1x without Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ (PBS-A) containing Tween 20 (0.05%), plasma diluted 1:50 in 200 μ l carbonate buffer were added (in duplicate) and plates incubated at 37°C for 90'. Wells were then washed with PBS-A 1x/Tween 0.05%, followed by the addition of 100 μ l of the secondary antibody (diluted 1:1000 in PBS-A 1x/Tween 0.1%/BSA 1%) conjugated with horseradish peroxidase, for 90' at room temperature. After 5 washings of the wells, 100 μ l of substrate (ABTS 1 mM, Amersham) were added for 30-45' at room temperature. Reading was performed at the spectrophotometer (405 nm). Each ELISA included an anti-Tat rabbit polyclonal serum (positive control) diluted 1:200 to 1:6400, and the preimmune plasma (negative control) diluted 1:50. The cut-off value was calculated as the mean of the optical densities (O.D.) of negative monkey plasma +3 standard deviations (S.D.), obtained in all the experiments with the preimmune plasma. The results shown are the average of duplicate wells. >2,7 indicates that optical density values were out of scale.

FIG. 3. Titration of anti-Tat antibodies in plasma from monkeys inoculated with 100 (M1) and 10 (M2) μ g recombinant Tat protein, described in Fig. 2.

Elisa were carried out as described in figure 2 and plasma assayed (in duplicate) at scalar dilutions from 1:50 to 1:25.600.

The values in the ordinate represent the inverse of the highest plasma dilution at which the test was still positive. The cut-off value was calculated for each dilution and corresponded to the average O.D. of preimmune plasma from all monkeys in all experiments, + 3 S.D.

FIG. 4. Mapping of the Tat epitopes recognized by the anti-Tat IgG from monkeys injected with 100 (M1) and 10 (M2) μ g of recombinant Tat protein, described in fig. 2. For epitope mapping Elisa were carried out using 8 synthetic peptides corresponding to Tat amino acids (aa) 1-20, 21-40, 36-50, 46-60, 52-72, 56-70, 65-80, 73-86. One hundred microlitres of each peptide (10 μ g/ml in PBS-A/0.1% BSA) were absorbed onto a PVC 96-well plate for 12 hours at 4°C. Plates were

then washed and incubated with 100 μ l of PBS-A/3% BSA for 2 hours at 37°C. After incubation, plates were washed with PBS-A/0.05% Tween 20 and then 50 μ l of plasma, diluted in PBS-A and 3% BSA, were added to each well. Elisa were then continued as described in figure 2. Plasma were obtained at week 37 after the primary immunization. Cut-off values, calculated for each peptide and for each plasma dilution, correspond to the average O.D. of the preimmune plasma in all experiments + 3 S.D. (A) shows the average results of plasma diluted 1:50 for each peptide tested in duplicate; (B) shows the antibody titers of plasma shown in (A), expressed as the reciprocal of the highest dilution, at which the test was still positive.

FIG. 5. Analysis of the specific anti-Tat IgM response in monkeys inoculated with Tat and determined by ELISA. Three monkeys (M1-3) were inoculated subcute with 10 μ g of recombinant Tat protein re-suspended in 250 μ l autologous serum and 250 μ l RIBI; 3 monkeys (M4-6) were inoculated subcute with 10 μ g of recombinant Tat protein re-suspended in 250 μ l autologous serum and 250 μ l Alum; 2 control monkeys were inoculated subcute with RIBI (250 μ l and 250 μ l of autologous serum) (M7) or with Alum (250 μ l and 250 μ l of autologous serum) (M8). The monkeys were inoculated at time 0 and after 2, 6, 11 and 15 weeks. The presence of antibodies was investigated at 2, 6, 11 and 15 weeks. The ELISA method is described in fig. 2. In this case the plasma of the animals were tested (in duplicate) at 1:100 dilution and an IgM goat anti-monkey serum (diluted at 1:1000) conjugated with horseradish peroxidase was used as the secondary antibody.

The cut-off value was calculated as the average (+2 S.D.) of the O.D. values of the preimmune plasma. Results are the average of the O.D. values (at 405 nm) of two wells subtracted of the cut-off value (Δ O.D. 405).

FIG. 6. Analysis of specific anti-Tat IgG production in monkeys inoculated with Tat, tested by ELISA. Three monkeys (M1-3) were inoculated with 10 μ g of recombinant Tat protein re-suspended in 250 μ l of autologous serum and 250 μ l RIBI; 3 monkeys (M4-6) were inoculated with 10 μ g of recombinant Tat protein resuspended in 250 μ l autologous serum and 250 μ l Alum; two control monkeys

were inoculated with RIBI (250 μ l and 250 μ l of autologous serum) (M7) or with Alum (250 μ l and 250 μ l of autologous serum) (M8). The monkeys were inoculated at time 0 and after 2, 6, 11, 15, 21, 28 and 32 weeks. At week 36, monkeys M1 to M6 were inoculated with 16 μ g of Tat protein resuspended in 200 μ l of ISCOMs and 300 μ l of PBS. Antibodies were evaluated also at week 40 and 44. The ELISA method and the cut-off value determination are described in fig. 2. The results shown refer to samples diluted 1:50. >2,7 indicates that the O.D. value was out of scale.

FIG. 7. Titration of anti-Tat antibodies in plasma from the monkeys inoculated with recombinant Tat (10 μ g) in the presence of RIBI (M1-3) or Alum (M4-6) described in Figure 6. The results are shown for each plasma as the inverse of the highest serum dilution at which the test was still positive.

FIG. 8. Epitopes of Tat recognized by anti-Tat IgG from monkeys inoculated with recombinant Tat protein (10 μ g) in the presence of RIBI (M1 to M3) or Alum (M4 to M6), described in figure 6. Plasma were obtained at week 21 after the primary immunization. The Elisa method and the cut-off determination are described in figure 4. Results in (A) refer to samples diluted 1:50 and are the average from duplicate wells. Results in (B) refer to the titration of plasma shown in (A) and are expressed as the highest reciprocal dilution of plasma at which the test was still positive.

FIG. 9. Analysis of Tat specific CTL. The assay was carried out as described in Table 5. Shown is an example at the 36th week for monkey M1, injected subcutaneous with 10 μ g of Tat and RIBI as described in figure 6. Squares (control) correspond to the cells incubated with unpulsed BLCL target cells; rhombs correspond to the cells incubated with the BLCL target cells pulsed with Tat (1 μ g/250.000 cells).

FIG. 10. Analysis of the response of delayed hypersensitivity to Tat by skin test. Tat protein (5, 1 and 0.2 μ g), re-suspended in 150 μ l PBS containing 0.1% BSA or the buffer in which Tat was resuspended were inoculated intradermally (i.d.) in a shaved area on the animal back. The area was photographed at time 0 and after 24, 48 and 72 hours. The control monkeys were inoculated only with buffer. Shown is an example of monkey M2 (week 15), inoculated with 10 μ g of Tat and

RIBI, described in Fig 6. The positive reaction to Tat was evident at 48 hours after the skin test.

FIG. 11. Humoral IgG response to Tat in one monkey (M1) inoculated i.d. with 200 μ g of the pCV-Tat plasmid resuspended in 150 μ l of PBS-A, in two sites close to the axillary lymph-nodes; one monkey (M2) was injected with 500 μ g of pCV-Tat, resuspended in 250 μ l of PBS-A, intramuscular in two sites of the back; the control monkey (M3) was not inoculated with Tat DNA but received, as a control of specificity, repeated skin tests with Tat. Monkeys were injected with pCV-Tat at time 0 and after 5, 10, 15, 22, 27, 32 and 37 weeks. Finally, after 42 weeks, monkeys were boosted with recombinant Tat protein (16 μ g) resuspended in 200 μ l of ISCOMs and 300 μ l of PBS. Antibodies were evaluated at weeks 2, 5, 10, 15, 22, 27, 32, 37, 42, 48 and 58. Anti-Tat antibody response in plasma (diluted 1:50) was analyzed by Elisa as described in figure 2. Results are the average ODs of duplicate wells. (A) shows the results obtained from the two monkeys vaccinated with 200 (M1) and 500 (M2) μ g of pCV-Tat plasmid. (B) shows the results of the control monkey (M3).

FIG. 12. Titration of anti-Tat antibodies in plasma from monkey M2 inoculated i.d. with 200 μ g of pCV-Tat. The Elisa is described in figure 2. Results in ordinate are expressed as the reciprocal of the highest dilution at which the test was still positive.

FIG. 13. Analysis of anti-Tat IgG production in three monkeys (M9 to M11) inoculated with 1 mg of pCV-Tat and in one control monkey (M12), inoculated with 1 mg of control vector pCV-0. DNA was resuspended in 1 ml of PBS-A and injected intramuscularly in two sites of the back. Monkeys were inoculated at time 0 and after 6, 11, 15, 21, 28 and 32 weeks. At the 36th week monkeys M9 to M11 received a boost with 16 μ g of recombinant Tat protein resuspended in 200 μ l of ISCOMs and 300 μ l of PBS. The presence of anti-Tat antibodies was evaluated at weeks 2, 6, 11, 15, 21, 28, 32, 36, 40 and 44. Elisa and cut-off determination are described in figure 2.

FIG. 14. Kinetics of the proliferative response of PBMC from *Macaca fascicularis* to the co-stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies on

paramagnetic beads (anti-CD3/28 beads). The PBMC were depleted of the CD8-positive sub-population by immuno-magnetic methods. Afterwards, half of anti-CD8-depleted lymphocytes was stimulated with PHA and IL-2 (40U/ml) starting from day 3; the remaining part was left to adhere on the anti-CD3/28-coated beads antibodies, thus obtaining a CD8-depleted and CD3/28 positive lymphocyte population. IL-2 (40U/ml) was added to this cell fraction starting from day 10 of culture. The cells were counted and their viability was determined each 2-3 days. The beads:cells ratio was maintained constant. The number of cells at different time-points is reported.

- 10 **FIG. 15.** Antiviral effect of the co-stimulation with anti-CD3/28 beads on PBMC of *Macaca fascicularis*. The CD8-depleted and CD8-depleted CD3+/CD28+ lymphocytes, obtained from 4 monkeys (Figures 15A to 15B) by the methods described in Figure 14, were stimulated as described in example 7. The two fractions were infected *in vitro* at the day 0 with 0.1 M.O.I. of SIVmac251/63M.
- 15 The stimulation was performed with PHA and IL-2, added since day 3, and with the anti-CD3/28 beads without the addition of exogenous IL-2. Viral production was evaluated by determining the p27 levels (ng/ml) in the cell supernatants at days 6 and 12 after infection as described in example 7. (In light grey PHA*IL2, in dark grey Anti-CD3/28 beads on PBMC CD8-/CD3+/CD28*).
- 20 **FIG. 16.** Functional characterization of dendritic cells (DC) obtained from monkey's peripheral blood. (A) ³H-Thymidine incorporation at day 4 of allogeneic mixed leukocyte culture (AMLR) to compare the antigen-presenting-function (APC, determined as the induction of proliferation of allogeneic T cells) of DC and macrophages (Mø) obtained from PBMC of *Macaca fascicularis* after separation
- 25 on Percoll gradient and adherence on plastic. Non-adherent cells were removed and adherent cells were induced to mature into DC by adding GMCSF (200 ng/ml) and IL-4 (200 units/ml) every 3 days. Half of the culture medium (RPMI, 10% FCS) was removed and substituted with fresh medium every 3 days. After 6-7 days a morphological change of cytokine-induced cells was observed, which acquired a
- 30 typical DC phenotype (loss of adherence, clustering, fingers), also verified by determining typical membrane markers (data not shown). Monocytes were not

cytokine-induced and were cultured in the same medium, that was replaced every 3 days. The cells maintained the monocyte-macrophage characteristics, such as the adherence. At day 7 both cell populations were challenged with T-lymphocytes from a human blood donor, purified by Ficoll and Percoll gradient and by adherence and then frozen. Cell proliferation assays were carried out in a 48-well plate. Five hundred thousand T lymphocytes were stimulated with 5000 DC or Mø (T:APC ratio = 100:1). The culture was maintained for 4 days and fixed aliquots of the cell suspension were transferred in 96-well plates, in triplicate. 1 μ Ci of 3 H-Thymidine was then added for 16 hours, and the counts per minute (cpm) of the incorporated precursor were determined with a β -counter.

(B) APCs, such as DC and Mø, obtained as reported in figure 16A, were challenged with T lymphocytes from another monkey, obtained as reported above for the human donor. The greater ability to present the antigen is a typical characteristic of the DC as compared to Mø. APCs were added at scalar concentrations to T lymphocytes in order to evaluate the proliferative responses obtained at different T:APCs (DC or Mø) ratios.

The following examples should be considered illustrative and not limitative of the scope of the invention.

Example 1. Expression, purification and characterization of the wild type Tat protein (IIIB isolate), mutated Tat proteins and wild type Tat peptides.

Many difficulties have been encountered in the past to purify and maintain the biological activity of the Tat protein owing to the easiness to oxidate, aggregate and lose activity. This is due to the high amounts of cysteine residues which can form intra- and inter-molecular bonds, thus modifying the conformation of the native protein (Ref. 159, 41). The cDNA or the tat gene (Seq. 1, example 2), which has been cloned in the pL-syn vector, provided by Dr. J. F. DeLamarier and B. Allet (Glaxo Institute for Molecular Biology S.A., Ginevra, Svizzera), has been used for the expression of the protein in E.Coli.

In order to achieve an efficient immunization with Tat for vaccine purposes, the inventor considers fundamental to obtain a biologically active Tat protein as described in the section "Detailed description of the invention". Therefore, the

methods of production and purification of Tat, described in this example and in the next examples 1B, 2 and 3, describe necessary procedures and controls to obtain a biologically active Tat protein, which is an effective immunogen to protect from HIV infection, AIDS or from the development of HIV-related diseases.

- 5 A first method which we used to obtain an active protein, was based on successive steps of high pressure liquid chromatography and liquid and ion-exchange chromatography (Ref: 15, 41). The protein obtained by these methods is more than 95 % pure and it is active (Ref. 41, 42).

- However a good reproducibility was not obtained from batch to batch, owing to the
10 protein oxidation, which is the main problem in the commercial Tat preparations. Owing to our observations that the basic region of Tat protein has a strong affinity for heparin and that heparin prevents its oxidation, we used the heparin affinity chromatography and defined a new Tat purification protocol, as described by Chang et al., (Ref. 26). Cells (10 gr. in weight) of *E.coli* expressing Tat were
15 sonicated in 40 ml of lysis buffer (disodium phosphate 20mM, pH 7.8; glycerol at 2.5%; PMSF 0.2 mM; DTT 5 mM; mannitol 50 mM; ascorbic acid 10 mM; NaCl 500 mM) by using an Ultrasonic Liquid Processor (Model XL2020, Heat System Inc) with three discharges, each one of 20 sec. The lysate was centrifuged at 12,000 g for 30 min. and the supernatant was incubated for one hour at room
20 temperature with 2 ml of heparin sepharose resin, pre-washed with the lysis buffer. The resin was loaded on a glass column and washed with the lysis buffer until the protein was undetectable in the washing medium. The bound material was eluted with lysis buffer containing 2M NaCl and the eluate was collected in fractions of 1 ml. The homogeneity of the eluted protein was analyzed by gel
25 electrophoresis (SDS-PAGE). The purified protein was stored lyophilized at -70°C and resuspended in a degassed buffer before use.

- The biological activity of purified Tat protein, according to the above protocol, was evaluated by a "rescue" assay of viral infection in HLM-1 cells, derived from HeLa-CD4+ cells, containing proviruses defective in the *tat* gene, obtained and
30 described by Sadaie et al.. (Ref. 140). The "rescue" assay of viral infection, described by Ensoli et al.. (Ref. 41), consisted in complementing the lack of Tat

expression in HLM-1 cells (2×10^5) with the addition of exogenous Tat protein (2 $\mu\text{g/ml}$) and by evaluating viral replication by the determination of the p24 antigen released in the culture medium 48 hours after the addition of the exogenous Tat protein by commercial kits. The results of the "rescue" experiments, described by
5 Chang et al. (Ref. 26), demonstrate that the Tat protein, purified with this method, is active and that this purification method is better, easier and less expensive for both the purity and the biological activity of Tat when compared to the previously described methods (Ref. 40, 41, 42).

Different preparations of recombinant Tat, purified as described above, were
10 inoculated in the presence of Freund's adjuvant in mice and rabbits, according to standard protocols (Ref. 4). The results of the antibody response induced by the immunization are shown in Table 1.

TABLE 1.

Analysis of the anti-Tat specific antibody response in sera from mice and rabbits immunized with the recombinant Tat protein.

anti-Tat Antibody	OD-ELISA/Tat			Western
	1:500	1:1000	1:2000	Blot
Rabbit	0.651	0.400	0.175	+
Mouse	0.502	0.240	0.150	+

The recombinant Tat protein produced in *E. coli* was utilized to immunize mice and rabbits according to standard immunization protocols (Ref. 4). The sera of the immunized animals were analyzed by ELISA for the presence of anti-Tat antibodies by using three serum dilutions (1:500 to 1:2000). The results are the mean of the readings at 405 nm of two rabbits and three mice. Moreover, the sera were tested by Western blot with the recombinant Tat protein (100 ng).

- 10 The results of Table 1 demonstrate that the recombinant Tat, prepared by us, was able to induce an antibody response in both animal species, as tested with ELISA and Western blot which utilizes the recombinant Tat protein. Such antibodies were able to inhibit the internalization and the biological activities of Tat (Ref. 40. 41. 42). The pL-syn vector and the purification protocol of Tat protein are used to
- 15 express and purify the mutants of Tat described in Example 2. The biological activity of the mutated and purified Tat proteins is measured by "rescue" assays of viral infection in HLM-1 cells, assays of proliferation of KS cells and *in vivo* in mice, as described above for the wild-type Tat protein. Moreover, the mutated Tat proteins are tested in the presence of wild-type Tat (at serial concentrations) to
- 20 verify the negative transdominant effect on viral replication. The pL-syn vector and the purification protocol are used to express and purify fusion proteins of this type: Tat (wild type or mutants thereof)/IL-12 or Tat (wild type or mutants thereof)/IL-15 or parts of the same or Tat (wild type or mutants thereof)/other molecules (or parts thereof) able to enhance the immune response to Tat alone or associated with
- 25 other viral products. Fusion recombinant molecules are made by utilizing the sequences and the primers described in examples 2 and 3. As an alternative, synthetic peptides, corresponding to regions of Tat or of other viral products or of

cytokines to be used in combination with Tat are utilized as immunogens. The peptide sequences of Tat are:

Pep. 1. MEPVDPRLEPWKHPGSQPKT

Pep. 2. ACTNCYCKKCCFHCQVCFIT

5 Pep. 3. QVCFITKALGISYGRK

Pep. 4. SYGRKKRRQRRRPPQ

Pep. 5. RPPQGSQTHQVSLSKQ

Pep. 6. HQVSLSKQPTSQSRGD

Pep. 7. PTSQSRGDPTGPKE

10 The Tat mutant peptides will contain the same amino acid substitutions of the mutated Tat proteins, described in the Example 2. The peptides will be utilized in combination with the peptide representing the universal T-helper epitope of the tetanous toxoid or with other peptides representing T-helper epitopes (Ref. 77).

Example 1A. Uptake of picomolar concentrations (10 to 100 ng/ml) of biologically active Tat by activated endothelial cells is mediated by integrin receptors.

15

When normal endothelial cells are activated in vitro with inflammatory cytokines, they become responsive to the effects of extracellular Tat and this is due to the induction of the $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ integrins (Ref. 9, 10). Similarly, inflammatory

20 cytokines (IC) or bFGF increase integrin expression on endothelial cells in vivo and this leads to a synergistic KS-promoting effect when a biologically-active Tat is inoculated in mice simultaneously or after bFGF (Ref. 42). In addition, IC-activated endothelial cells acquire APC function.

In this example it is shown that endothelial cells activated with IC take up

25 rhodaminated biologically-active Tat protein more efficiently and that this is mediated by the integrin receptors.

Because of the difficulty in observing the internalization of very low concentrations of cold Tat, the protein was labeled with rhodamin (Ref. 98). The rhodaminated Tat still showed activation of KS cell proliferation in the same concentration range

30 as unlabelled Tat, indicating that the labeling procedure did not compromise its biological function. Tat uptake experiments were performed as follows: human

umbilical vein (HUVE) cells were grown and treated for 5 days with IC as described (Ref. 9, 46). The cells were then trypsinized, plated on 8 well slides (Nunc Inc., Naperville, IL) at 0.5×10^5 cells per well and incubated for 18 hours in medium containing 15% fetal bovine serum (FBS), in the presence of IC. Serum free (SF, RPMI, 1% BSA, 0.1% antibiotics, fungizon) media were added and slides were pre-incubated for 2 h at 4° C. Fresh medium, containing serial dilution of rhodaminated Tat, was added to the cells and the cells were incubated at 37°C for the time indicated. Negative controls were rhodaminated BSA in the same buffer as Tat. Cells were fixed in ice-cold acetone- methanol (1:1) and uptake and localization of Tat visualized and photographed using fluorescence microscopy. Results were evaluated by comparing the fluorescence of samples with the negative control and scored from 0 to ++++ on the amount of uptake without prior knowledge of sample code.

To investigate the pathways by which Tat is taken up by activated endothelial cells, experiments were carried out using activated HUVE cells with a wide range of concentrations of exogenous Tat, such as those previously used to induce HUVE or KS cell growth (10-50 ng/ml), or HIV-1 transactivation by adding the protein to cells carrying the HIV-1 promoter or the provirus (0.5 to 1 ug/ml).

In these experiments, for consistency with uptake inhibition experiments (see below), cells were pre-incubated at 4°C for 2 hours with medium lacking fetal calf serum. This pre-incubation does not affect the subsequent uptake of rhodaminated Tat.

With rhodaminated Tat, the uptake and translocation of the protein to the nucleus or nucleoli of activated HUVE cells began to be evident within 15 minute incubation with as low as 10 ng/ml rhodaminated Tat. The density of uptaken Tat in the cells was increased in a dose-dependent and time-dependent manner. Rhodaminated BSA or buffer showed no signals and were used routinely as negative controls.

To determine whether uptake of Tat by activated HUVE cells was mediated by the same integrins found expressed on KS cells, inhibition experiments were performed by pre-incubating IC-activated endothelial cells with cold Tat

(competitor), the physiological ligands for these receptors such as fibronectin (FN) or vitronectin (VN), or by pre-incubating the cells with monoclonal antibodies directed against the RGD binding regions of the $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ receptors. The experimental procedure is briefly reported. After plating on 8 well slides, HUVE
5 cells were incubated with medium containing 15% FBS for 18 h and then incubated with SF medium containing unlabelled Tat (cold competitor) (Table 1A), FN, VN (Table 1B), or monoclonal antibodies directed against the RGD binding sequence of the FN or VN receptors ($\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$, respectively), or monoclonal antibodies directed against human factor VIII (control antibodies) (Fig. 1A) for 2 h
10 at 4° C. The cells were then incubated with rhodaminated Tat for the periods of time indicated. The control consisted of cells treated with SF medium alone for 2h at 4° C and incubated with rhodaminated BSA. The cells were fixed, visualized, photographed and results scored as indicated above.

TABLE 1A.

5 *Inhibition of uptake of 100 ng/ml and 1 µg/ml rhodaminated Tat by cytokine-activated HUVE by pre-incubation of the cells with 1 µg/ml of unlabelled Tat.^a*

Pre-incubation	Rhodaminated Tat	Uptake of Tat
Serum Free Medium	100 ng/ml	+++
1 µg/ml Unlabelled Tat	100 ng/ml	+/-
Serum Free Medium	1 µg/ml	++++
1 µg/ml Unlabelled Tat	1 µg/ml	+/-

^a HUVE cells were cultured as previously described (Ref. 40). IC were obtained from human T-lymphotrophic virus-type-II (HTLV-II) transformed CD4⁺ T cells or
10 phytohemagglutinin-stimulated T cells and the supernatants used (1:8) to activate HUVE cells (passage 8-14) for 5 days as previously described (Ref. 9, 46). This supernatant contains interleukin-1 α (IL-1 α) and - β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and - β (TNF- β), and interferon- γ (IFN- γ), (Ref. 9).

Tat protein was rhodaminated at lysine residues essentially as described (Ref.
15 98). Briefly, 50 µg recombinant Tat (2 mg/ml), was brought to pH 9.0 by the addition of 2.5 µl of 1M Na₂CO₃. Two point five µl of 1 mg/ml TRITC in dimethylsulfoxide (DMSO) was added and the reaction allowed to proceed for 8 hr at 4°C. Unreacted TRITC was quenched by the addition of 2.5 µl of 0.5M NH₄Cl, the pH was lowered to 7.0, using 1M HCl, and the rhodaminated Tat was dialyzed
20 against two changes of 50mM Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM dithiothreitol (DTT) to remove the quenched TRITC. BSA or PBS, rhodaminated in the same way, were used as negative controls. Rhodaminated Tat was tested for AIDS-KS cells growth activity as described to insure that biological activity was maintained (Ref. 40).

HUVE cells were pre-incubated for 2 hours with serum free medium or 1 µg/ml
25 unlabelled Tat in serum free medium, incubated with 100 ng/ml or 1 µg/ml rhodaminated Tat for 60 minutes and Tat uptake visualized by fluorescence microscopy. Negative controls (+/- uptake) were preincubation with serum free medium, followed by incubation with rhodaminated BSA.

TABLE 1B.

Inhibition of the uptake of 10 ng/ml rhodaminated Tat by cytokine-activated HUVE by pre-incubation of the cells with an excess of FN or VN^a.

5

Pre-incubation	Uptake of Rhodaminated Tat
Serum Free Medium	++++
100ng/ml FN	+/-
100ng/ml VN	+/-

^a HUVE cells were pre-incubated for 2 hours with serum free medium or FN or VN in serum free medium, incubated with 10 ng/ml rhodaminated Tat for 60 minutes and Tat uptake visualized by fluorescence microscopy. Negative controls (+/- uptake) were pre-incubation with serum-free medium, followed by incubation with rhodaminated BSA.

10

Uptake of Tat was inhibited by cold Tat (Table 1A), by FN or VN (Table 1B) or by prior treatment of the cells with monoclonal antibodies directed against the RGD binding regions of both the FN receptor, $\alpha_5\beta_1$, and the VN receptor, $\alpha_v\beta_3$ (Fig. 1A). The intensity of fluorescence in cells was reduced to levels seen with the negative control and no inhibition was observed by prior incubation of the cells with monoclonal antibodies directed against human factor VIII, used as negative control, indicating that inhibition was specific (Fig. 1A).

Uptake and nuclear localization of 100 ng/ml Tat was inhibited by pre-incubation of the cells with the monoclonal antibodies directed against the RGD binding region of the $\alpha_5\beta_1$ receptor and the $\alpha_v\beta_3$ receptor. However, in both instances inhibition was not complete. These results indicate that uptake of picomolar concentrations of Tat is mediated by the same integrins involved in cell adhesion to Tat (Ref. 10). However, at higher concentration of extracellular Tat (such as \geq 100 ng/ml), a non-integrin mediated pathway is responsible for the uptake of some of the protein.

In contrast with these results, the uptake of iodinated Tat with lymphocyte and epithelial cell lines was shown to be linear and in function of the concentration of Tat in the medium and was not or poorly competed by an excess of cold Tat, indicative of the lack of receptor involvement (Ref. 98). However, the concentration range of Tat in the medium in that study was approximately 1-100 μ g/ml (Ref. 98), much higher than those needed to observe uptake of Tat by cells responsive to its biological activity, such as activated primary endothelial cells. In addition, iodination of Tat may hamper its structure and its uptake by the cells and no results of biological activity of iodinated Tat were shown by those authors.

These results, that are unpublished, demonstrate that the uptake of Tat occurs by at least two pathways depending upon the concentration of the protein. At low (10-100 ng/ml) Tat concentrations, uptake of Tat is mediated by the $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ receptors through the interaction with the RGD sequence of the protein, whereas at higher concentration of extracellular Tat an integrin-independent pathway is more important. The integrin-mediated uptake of picomolar concentrations of Tat by IC-activated endothelial cells indicates a fully active protein capable of entering

antigen presenting cells, such as activated endothelial cells and dendritic cells, that initiate the immune response.

Example 2. Construction and characterization of mutated tat genes.

We produced 19 mutants in different Tat regions by means of site specific
5 mutagenesis or by deletion. The sequence of each mutated DNA was controlled
by sequencing. The cDNAs of the tat mutated genes were cloned in the PstI site
of the pCV0 vector, described in the Example 3. Each mutant was co-transfected,
as described by Ensoli et al. (Ref. 41) in COS-1 cells or in the Jurkat T-cell line
with the HIV-1 LTR-CAT plasmid, in which the CAT reporter gene is driven by the
10 HIV-1 LTR. The results of these experiments, not published, are reported in Table
2.

TABLE 2

Effect of Tat mutants on the HIV-1 LTR-CAT transactivation and blocking effect (negative transdominant) on the Tat wild-type activity

MUTANTS	Transactivating activity ^a		Transdominant activity ^b
	Mean (fold)	(min-max values)	(% inhibition) Mean
CYS 22	0.09	(0.021-0.22)	21
THR 23	0.36	(0.16-1)	
THR 23A	0.30	(0.16-0.78)	
ASN 24	0.34	(0.34-0.82)	
ASN 24A	0.42	(0.45-0.95)	
TYR 26	0.14	(0.08-0.19)	
LYS 28/29	0.52	(0.19-1.04)	
CYS 30	0.30	(0.045-0.65)	
CYS 31	0.60	(0.27-1.09)	
PHE 32	0.31	(0.077-0.097)	
LYS 33	0.04	(0.0027-0.068)	46
GLU 35	0.31	(0.19-0.43)	
PHE 38	0.05	(0.043-.057)	98
LYS 41	0.04	(0.025-0.061)	
TYR 47	0.58	(0.31-0.8)	97
57 A	0.35	(0.26-0.44)	
TAT-RGD	0.94	(0.73-1.15)	
TAT-KGE	1.11	(0.67-1.49)	
TAT wild-type	1	1	

5

^aThe results are given as the increment of activation of CAT activity values induced by the wild-type Tat (Fold=1). ^bThe results are expressed as percent (%) inhibition of the wild-type Tat activity.

From the results presented in Table 2 it is evident that for the majority of the mutants the transactivating effect of the HIV-1 LTR was reduced or absent, with the exception of the RGD mutant, which had an activity similar to wild-type Tat. We selected the 4 mutants (cys22, lys33, phe38, lys41) having the lowest (almost zero) transactivating activity and determined the negative transdominating effect on the transactivating activity of wild-type Tat. To this end, COS-1 cells were co-transfected with each vector containing a Tat mutant and the pCV-Tat vector (in a molar ratio of 10:1) in the presence of the HIV-1 LTR-CAT vector. As shown in Table 2, the lys41 and tyr47 mutants inhibited almost completely Tat activity, while

15

the lys33 and cys22 mutants partially inhibited the Tat activity. However, the cys22 recombinant protein (described in following Example 3) competed the wild-type Tat protein in transactivating the HIV-1 LTR-CAT (fig. 1B). A mutant in the cysteine region (cys22), one in the core region (lys41), one deleted of the RGD sequence (RGD Δ) and a double mutant containing the mutation in lys41 and the
5 deletion of the RGD sequence (lys41-RGD Δ) were selected.

The sequence of the tat insert and of the mutants selected for the vaccination is reported hereinafter. A series of tat mutants is described prepared by 1) substitution of a base to obtain an amino acidic substitution and 2) deletion of a
10 base to obtain a deletion of the correspondent amino acids. The substitutions and deletions were obtained by site direct mutagenesis. The sequences of the wild-type tat gene and of the tat gene mutants, hereinafter reported, were inserted in the pCV0 plasmid vector as described above.

With Seq. 1 it is intended the HIV-1 tat gene sequence, from BH-10 clone and its
15 derived protein. With Seq. 2 it is intended the cys22 mutant sequence (and its derived protein), represented by a substitution of Timine (T) nucleotide in position 66 starting from the 5' end with the Guanine (G) nucleotide. This substitution originates, in the derived amino acidic sequence, a substitution of a Cysteine (C in one letter code) in position 22 at the amino-terminal end, with a Glycine (G in one
20 letter code). With Seq. 3 it is intended the lys41 mutant sequence (and its derived protein), represented by a substitution of the Timine (T) nucleotide in position 123 from the 5' end with the Cytosine (C) nucleotide. This substitution originates, in the derived amino acidic sequence, a substitution of a Lysine (K in one letter code) in position 41 from the amino-terminal end, with a Threonine (T in one letter code).
25 With Seq. 4 it is intended a sequence of the RGD mutant (and its derived protein), represented by the deletion of the nucleotide sequence CGAGGGGAC, from nucleotide 232 to nucleotide 240, starting from the 5' end of the wild-type tat gene. This gives a deletion of the amino acids Arginine-Glycine-Aspartic acid (RGD in one letter code) in the positions 78-80 from the amino-terminal end. With Seq. 5 it
30 is intended a sequence of the double lys41-RGD Δ mutant (and its derived protein), originated by the combination of the above described mutants.

Wild-type *tat* nucleotide sequence (Seq. 1)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCA
GCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCATTGCCA
AGTTTGTTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
5 AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTAT
CAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAAT
AG 3'

Amino acid sequence

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALG
10 ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Cys22 mutant nucleotide sequence (Seq. 2)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCA
GCCTAAAACTGCGGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCATTGCCA
AGTTTGTTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
15 AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTAT
CAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAAT
AG 3'

Amino acidic sequence

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTAGTNCYCKKCCFHCQVCFITKA
20 LGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Lys41 nucleotide sequence (Seq. 3)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCA
GCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCATTGCCA
AGTTTGTTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
25 AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTAT
CAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAAT
AG 3'

Amino acidic sequence

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG
30 ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

RGDΔ mutant nucleotide sequence (Seq. 4)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCA
GCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCATTGCCA
AGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTAT
5 CAAAGCAGCCACCTCCCAATCCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG 3'

Amino acidic sequence

NH₂-MEPVDPRLPEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKALG
ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVLSLKQPTSQSPTGPKE-COOH

Lys41-RGDΔ mutant nucleotide sequence (Seq. 5)

10 5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTCA
GCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCATTGCCA
AGTTTGTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
AGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTTCTCTAT
CAAAGCAGCCACCTCCCAATCCCCGACAGGCCCGAAGGAATAG 3'

15 **Amino acidic sequence**

NH₂-MEPVDPRLPEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTALG
ISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVLSLKQPTSQSPTGPKE-COOH

Example 3. Construction and characterization of the DNA immunogens.

The DNA molecules for the inoculation of animals are inserted in the 6.4 kb pCV0
20 plasmid vector (Ref. 5). This plasmid comprises two SV40 replication origins, the
major late promoter of the adenovirus (AdMLP) and the splicing sequences of the
adenovirus and of the mice immunoglobulin genes, the cDNA of mice
dihydrofolate-reductase gene (dhfr) and the SV40 polyadenylation signal. The site
for the PstI restriction enzyme is located at the 3' of the AdMLP, and represents
25 the site in which the exogenous gene of interest is cloned. The tat gene cDNA
(261 base pairs) (Seq. 1, example 2) of HIV-1 was derived from the HIV-1 BH10
clone (Ref. 126) and coded for a 86 amino acid-long protein. The pCV-Tat vector
(Ref. 5) was obtained by cloning the tat cDNA in the pCV0 PstI site, driven by the
AdMLP. The choice of this vector is based on that the AdMLP induced a higher
30 expression and release of Tat, with respect to other eukariotic promoters, such as,
for instance, the immediate early region promoter of the cytomegalovirus (CMV)

as demonstrated by Ensoli et al. (Ref. 41), and reported in Table 3.

TABLE 3. *Expression, subcellular localization, release and activity of Tat in COS-1 cells transfected with pCV-Tat and CMV-Tat^a.*

Vectors	Tat expression			Tat ^b content			Tat activity	
	Nucleus ^c	Cytoplasm (%)		Total	Intracell. (%)	Extracell (%)	Intracell. ^d (fold)	Extracell. ^e (cpm)
Positive Cells								
PCV-Tat	5-10	++	++	25	63,5	36,5	50	2.478
CMV-Tat	3-5	++	+	14,6	92,2	7,8	72	2.254
Controllo	0	-	-	0	0	0	1	1.400

^aCOS-1 cells (5×10^6) were transfected by electroporation with 30 μ g of pCV-Tat, CMV-Tat or a control DNA. 48 hours after transfection, Tat expression was evaluated by immunoistochemistry with anti-Tat monoclonal antibodies (given values are the mean of the percentage values of positive cells) and by localisation of nuclear and cytoplasmic Tat. The presence of intra- and extra-cellular Tat was analyzed by radioimmunoprecipitation on the cellular extracts (500 μ l) and in the culture media (4 ml) and subsequent densitometric reading (Gelscan XL; Pharmacia) of the precipitated Tat bands. The activity of intracellular Tat was measured on cellular extracts of COS-1 cells co-transfected with Tat expressing vectors, or the control vector, and the LTR-CAT HIV-1 plasmid; the extracellular Tat activity on the AIDS-KS cells proliferation (determined by ³H-thymidine incorporation assay) was measured in the culture medium (diluted 1:2 and 1:4) of the cells transfected with plasmids expressing Tat or the control plasmid. The results are the average of five independent experiments.

^bDensitometric analysis of the immunoprecipitated Tat protein band. Values are expressed in an arbitrary scale, the total detected minimum value (intra- and extracellular Tat) being 10.

^c-, negative; +, 50% of Tat-positive cells; ++, 50-100% of Tat-positive cells.

^dCAT activity after 20 minutes incubation with respect to the control vector, the activation value of which being considered 1.

^eAIDS-KS cell growth was measured by a ³[H]-thymidine incorporation assay (standard deviation, SD: 12%). The supernatants of the cells transfected with the control DNA had a ³[H]-thymidine incorporation of 1,400 cpm (SD: 11.5%). The

culture medium derived from activated T lymphocytes (positive control) had a ³[H]-thymidine incorporation of 2,400 cpm (SD: 10%).

Table 3 shows that in the pCV-Tat transfected cells, compared with the CMV-Tat transfected cells, the percentage of Tat-positive cells and the total Tat content are higher, the amount of released Tat is much higher and is related to the total and cytoplasmatic content of Tat, and the biological activity of the extracellular Tat on AIDS-KS cell growth is therefore higher. Such results show that the pCV-Tat vector codes for a biologically active protein, induces high expression levels of the tat gene and can release from the cells much higher Tat amounts than the CMV-Tat vector.

The pCV0 vector is utilized also for the expression of HIV-1 nef, rev and gag genes and of the genes coding for IL-12 and IL-15 cytokines. The cDNAs of nef (618 base pairs, NL43 strain) (Ref. 112) rev (348 base pairs, strain NL43) (Ref. 95) and the gag genes (1500 base pairs, strain NL43) (Ref. 95), or the cDNAs of IL-12 (Ref. 165) or IL-15 genes (Ref. 56) are amplified by polymerase chain reaction technique (PCR) by using specific primers complementary to the first 15 nucleotides of 5' region (primer forward) (Seq. P1, P3, P5, P7, P9) or to the last 15 nucleotides of 3' region of the gene (primer reverse) (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). Moreover, each primer, both forward and reverse, comprises the sequence for the restriction PstI enzyme to consent the cloning of the amplified product into the pCV0 vector. After cloning, the sequence of the inserted genes is controlled by DNA sequencing. The pCV0 vector is used also for the Tat co-expression with other viral genes of HIV-1 (rev, nef or gag) or with the IL-12 or IL-15 cytokine-coding genes. To this end the cDNA of the HIV-1 tat gene of 261 base pairs (Seq. 1, example 2) is amplified by PCR with a primer forward including the sequence for the PstI restriction enzyme (Seq. P11) and a primer reverse complementary to the last 15 nucleotides of the tat gene (Seq. P12). The viral genes (nef, rev or gag) or the genes coding for the IL-12 or IL-15 cytokines are amplified by a primer forward which includes also a sequence of 15 bases complementary to the tat 3' region, permitting the gene being in frame with the tat gene (Seq. P13, P14, P15, P16, P17), and a primer reverse including the sequence for the PstI restriction

enzyme (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). Afterwards, a third PCR reaction is performed in which the DNA template is represented by the amplified products of the tat gene and of the gene of interest. The primer forward is represented by the primer utilized to amplify tat (Seq. P11) and the primer reverse by the one utilized in
5 amplifying the gene of interest (Seq. P2, P4, P6, P8, P10). The amplified tat/gene of interest is purified with agarose gel, digested with PstI and cloned in pCV0. After cloning, the sequence of the inserted genes is controlled by DNA sequencing, while the protein expression is determined by means of transfection as described above (Ref. 41).

10 The sequences of the above mentioned primers are:

Seq. P1. Primer forward Rev: 5'ATGGCAGGAAGAAGC3'

Seq. P2. Primer reverse Rev: 5'CTATTCTTTAGTTCC3'

Seq. P3. Primer forward Nef: 5'ATGGGTGGCAAGTGG3'

Seq. P4. Primer reverse Nef: 5'TCAGCAGTCCTTGTA3'

15 Seq. P5. Primer forward Gag: 5'ATGGGTGCGAGAGCG3'

Seq. P6. Primer reverse Gag: 5'TTATTGTGACGAGGG3'

Seq. P7. Primer forward IL-12: 5'ATGTGGCCCCCTGGG3'

Seq. P8. Primer reverse IL-12: 5'TTAGGAAGCATTGAG3'

Seq. P9. Primer forward IL-15: 5'ATGAGAATTTGAAA3'

20 Seq. P10. Primer reverse IL-15: 5'TCAAGAAGTGTGAT3'

Seq. P11. Primer forward Tat: 5'ATGGAGCCAGTAGAT3'

Seq. P12. Primer reverse Tat: 5'CTATTCCTTCGGGCC3'

Seq. P13. Primer forward Tat/Rev: 5'GGCCCGAAGGAAATGGCA
GGAAGAAGC3'

25 Seq. P14. Primer forward Tat/Nef: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGT
GGCAAGTGG3'

Seq. P15. Primer forward Tat/Gag: 5'
GGCCCGAAGGAAATGGGTGCG
AGAGCG3'

30 Seq. P16. Primer forward Tat/IL-12: 5' GGCCCGAAGGAAATGTGGC
CCCCTGGG3'

Seq. P17. Primer forward Tat/IL-15: 5' GGCCCGAAGGAAATGAGAAT
TTCGAAA3'

Example 4. Inoculation in healthy *Macaca fascicularis* of an anti-Tat protein vaccine: evaluation of safety, tolerability, specific immune response and protective efficacy against virus challenge.

The tolerability, safety and the ability to elicit a specific immune response (humoral and cellular) and protection against virus challenge of the recombinant Tat protein vaccine, produced by the described method and purified through heparin-affinity columns, was assessed in the experimental model of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). In order to induce a broad immune response we used aluminium phosphate (Alum) that has been tested in numerous models and it is the sole approved for human use. Among particulate adjuvants we used RIBI (belonging to the group of emulsifiers or composed by monophosphorylic lipid A, dimycolic trehasole and skeleton of the bacterial wall of Calmette-Guerin bacillus) (Ref. 7, 109).

In the first pilot experiment we evaluated the tolerability, the safety and the ability to elicit a specific immune response (humoral and cellular). Thus, 3 monkeys were inoculated according to the following schedule: monkey 1 (M1) was inoculated with the recombinant Tat protein (100 µg), resuspended in 250 µl of autologous serum and 250 µl of RIBI, by the subcute route in one site; monkey 2 (M2) was inoculated with the recombinant Tat protein (10 µg), resuspended in 250 µl of autologous serum and 250 µl of RIBI, by the subcute route in one site; and monkey 3 (M3) was the control monkey not inoculated. Ten ml of blood were withdrawn from all monkeys at days -42 and -35 preceding the first vaccine inoculation in order to determine the basal parameters. Serum and plasma samples were frozen at -20°C or -80°C and used later to resuspend the protein inoculum. Monkeys 1 and 2 were inoculated at time 0 and after 2, 5, 10, 15, 22, 27, 32 and 37 weeks. The immunization schedule was interrupted at week 37 for monkey M1 and at week 41 for monkey M2. Animals were sacrificed to study the immunological parameters in several organs and tissues (spleen and lymph nodes), such as the evaluation of the presence of a proliferative response to Tat,

and of CAF and CTL activities against Tat. CAF activity is the antiviral activity mediated by CD8⁺ lymphocytes, neither MHC-restricted nor cytolytic. In the same days of the inoculation of the immunogen, 10 ml of blood were withdrawn from each animal to perform laboratory tests (chemo-physic analyses, electrolytes, leukocytes, platelet counts and haemoglobin quantitation), the evaluation of the immunological parameters, such as the presence of specific immunoglobulins (IgM, IgG, IgA), the levels of Th1 type- (IL-2, IFN γ) and Th2 type-cytokines (IL-4, IL-10), the production of chemokines (RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β), the lymphocytic phenotype (CD4, CD8, CD3, CD14, CD20, CD25, CD56, HLA-DR, CD45RA), the proliferative response to Tat, the presence of specific cytotoxic activity (CTL), the presence of antiviral activity (CAF), and the presence of total antiviral activity (TAA) mediated by PBMC and by autologous serum. Moreover, to evaluate the *in vivo* presence of a cell-mediated immune response, all vaccinated and control monkeys were subjected to a skin-test to Tat.

The results of this experiment are as follows. No alterations of the chemo-physic, haematologic and behavioristic parameters were observed. In vaccinated and control monkeys, signs of inflammation and neo-vascularization were not detected at the sites of inoculation. These results indicate that the Tat protein was well tolerated by the animals and that was non-toxic at the administered doses and at the given inoculation route. In monkeys M1 and M2 the presence of antibodies of the IgG type specific to Tat were detected at week 5 after the first inoculation. At week 37, anti-Tat IgG were detectable up to 1:6400 plasma dilution in both monkeys, and, at week 41, up to 1:12.800 plasma dilution in monkey M2. The results are shown in figures 2 and 3. In the control monkey M3, anti-Tat antibodies with low titers were detected, likely elicited by the repeated inoculations of low amount of Tat that was injected in this monkey to control the specificity of the skin test reactions. In monkeys M1 and M2, anti-Tat antibodies were mainly directed against the amino-terminal region (aa 1-20) of Tat, with a titer of 1:3200 (figure 4). In monkey M2, vaccinated with 10 μ g of Tat, antibodies directed against aa 36-50 and 46-60 of Tat were also detected, with titers of 1:50 and 1:100, respectively (figure 4). The ability of monkeys' serum to neutralize Tat was determined by

means of in vitro assays that measured the inhibition of the rescue of HIV-1 replication in HLM-1 cells after the addition of exogenous Tat protein, as previously described (Ref. 41). These assays demonstrated that plasma from monkeys M1 and M2, at week 27 after the first inoculation, blocked virus replication induced by exogenous Tat, as determined by quantification of p24 antigen in the culture supernatants. Conversely, preimmune plasma from the same monkeys did not block Tat activity (Table 4).

TABLE 4

Neutralizing activity of monkeys' plasma on the rescue of virus replication induced by extracellular Tat^a

Samples	Inhibition (%)
Tat (30 ng/ml) + Preimmune M1	0
Tat (30 ng/ml) + Preimmune M2	0
Tat (39 ng/ml) + Immune M1	79.12
Tat (30 ng/ml) + Immune M2	100

^aThe neutralizing activity of plasma was determined in HLM-1 cells (HeLa-CD4⁺ cells containing an integrated copy of an HIV-1 provirus defective in the tat gene). HLM-1 cells were seeded at 6×10^5 cells/well in 24-well plates and incubated at 37°C for 16 hours. Cells were washed twice with PBS, containing 0.1 % of bovine serum albumine (BSA), and cultured for 48 hours with fresh medium (0.3 ml) in the presence of recombinant Tat protein and an equal volume of the animal plasma, withdrawn at time 0 (preimmune plasma) or at week 27 (immune plasma). Negative controls were represented by cells treated only with the preimmune plasma pooled together, with the immune plasma pooled together or with PBS containing 0.1% BSA (PBS + 0.1%BSA), without Tat. In all control samples no effects were observed on the rescue of virus replication. Each plasma was tested in duplicate. The presence of virus released by the cells was assayed by quantitation of p24 Gag antigen, using a commercial p24 antigen capture ELISA kit (NEN-Dupont). The results are expressed as the percentage of inhibition of virus rescue [measured for each plasma as the average value of p24 (pg/ml) in two wells] by the immune plasma as compared to the preimmune plasma (0% inhibition). Monkeys M1 and M2 were vaccinated with the recombinant Tat protein

(100 μ g and 10 μ g, respectively) resuspended in 250 μ l of autologous serum and 250 μ l of RIBI, and injected by the subcute route in one site.

The results indicate the presence of a proliferative response to Tat at week 22 (Table 5) in monkeys vaccinated with the recombinant Tat protein, being higher in monkey M2 that received 10 μ g of recombinant Tat protein at each boost.

Table 5

Proliferative response to Tat^a

Monkey	Stimulus	Weeks from the primary immunization				
		15	22	27	32	37
M1	PHA	15.3	13.9	19.9	40.6	3.2
	TT	1.2	4.7	2.1	3.8	2
	Tat	0.8	2.4	1.1	1.3	0.6
M2	PHA	8.1	11.6	17.1	16.8	1.7
	TT	2	3.8	1.7	1	0.6
	Tat	0.9	3	1.4	1.2	0.6
M3	PHA	5.1	19.9	18.2	6.6	8.1
	TT	7.2	6.2	5.5	2.8	5.6
	Tat	2.1	1.4	1.3	0.7	0.9

^aPBMCs isolated by Ficoll density gradient were plated at a concentration of 2×10^5 cells/well in triplicates in a flat bottomed 96-well plate, cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and stimulated with Tat (1 or 5 μ g/ml), PHA (4 μ g/ml) or Tetanus Toxoid (TT) to which monkeys were vaccinated. Unstimulated controls were incubated in RPMI, 10% FCS medium. The increase of cellular proliferation was measured at day 5 by ³[H]-thymidine incorporation as previously described (Ref. 39, 22). Results are expressed as stimulation index and were calculated as follows: average of the test sample (cpm)/average of control (cpm). Values greater than 2.5 were considered positive. Monkeys M1 and M2 were immunized subcute with 100 μ g or 10 μ g of recombinant Tat resuspended in 250 μ l of autologous serum and 250 μ l of RIBI. M3 represents a control monkey. As shown in Table 6 no cytotoxic activity to Tat was detected in monkeys M1 and M2 immunized with recombinant Tat.

TABLE 6

Analysis of cytotoxic activity to Tat (CTL)^a

Monkey	Week	Target : Effector ratio						CTL activity
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Media	
M1	41	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M2	41*	0	0	0	0	0	0	-
M3	41	0	0	0	0	0	0	-

- ^aPBMCs isolated by Ficoll density centrifugation were resuspended at a concentration of 1×10^7 cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 10% heat inactivated FCS and seeded in a 24-well plate (500 μ l per well) for 12 hours at 37°C in the presence of 1 μ g of Tat. One day later, the cells incubated without Tat were centrifuged at 1500 rpm and resuspended in 50 μ l of RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, incubated for 3 hours at 37°C with 1 μ g of Tat, washed, resuspended in 500 μ l of fresh medium and added to the well containing the PBMCs previously stimulated. On day 2 the cells were diluted with 1 ml of medium containing IL-2 (2 IU/ml) and cultured for 14 days. Autologous B lymphocytes isolated from each monkey before the vaccine protocol were used as target cells (BLCL). To this aim, PBMCs isolated by Ficoll density centrifugation at day 35 were seeded at a concentration of 3×10^5 cells/well in a 96-well plate and cultured for 2 or 3 weeks in the presence of 50% of a medium collected from a cell line that produces Papiovirus as previously described (Ref. 28). Ten B cell lines obtained for each animal were expanded and frozen. To test the toxicity, the Delfia Cytotoxic Test (Wallac, Turku, Finland) based on the time resolved fluorescence was used (Ref. 12, 13, 14). To this aim, BLCL were cultured at a concentration of 1×10^6 cells/200 μ l of RPMI 1640 supplemented with 10% FCS containing 4 μ g of Tat for 12 hours at 37°C. As the control, another aliquot of autologous BLCL was incubated with the same medium without Tat. BLCL were washed and resuspended in 1 ml of RPMI 1640 supplemented with 10% FCS containing 5 μ l of fluorescence enhancing ligand and incubated for 15 min at 37°C according to the manufacturer's instruction. After 5 washings, BLCL were resuspended at a concentration of 5×10^4 cells/ml and promptly centrifuged in

order to harvest the supernatant that was used to measure the background level. PBMCs (Effectors) were seeded in duplicate at a concentration of 2.5×10^4 cells/100 μ l in medium containing IL-2 and properly diluted in a 96-well plate. 5×10^3 of target cells/100 μ l (cultured with or without Tat) were added to each well.

5 Target:Effector ratios were 1:50, 1:25, 1:12.5, 1:6.25, 1:3.125. PBMCs and target cells (Tat-pulsed or unpulsed) were incubated for 2 hours at 37°C with i) 20 μ l of 5% Triton to measure the maximum release, ii) 100 μ l of growth medium to detect the spontaneous release, iii) 200 μ l of supernatant from target cells to detect the background level. At the end of the incubation period the plates were centrifuged,

10 20 μ l of each supernatant were transferred into a new plate and incubated in the presence of 200 μ l of an Europium solution included in the kit. The fluorescence was measured after 20 min incubation with a time resolved fluorescence reader (Victor, Wallac, Turku, Finland). Specific CTL activity was measured as following:

15 % specific release = $\frac{[(\text{average of sample detection} - \text{background}) - (\text{spontaneous release} - \text{background})]}{[(\text{Maximum release} - \text{background}) - (\text{spontaneous release} - \text{background})]} \times 100$. The test was considered positive when the Tat specific-release was higher than 4% at most of the Effector : Target ratios tested. 4% is an arbitrary value established on the basis of previous control experiments . ND, not determined. Monkey M2 was immunized subcutaneous with 10 μ g of recombinant Tat resuspended in 250 μ l of autologous serum and 250 μ l of RIBI. M3 represents a

20 control monkey.

ND: not done.

* PBMCs were isolated from peripheral lymph nodes when M2 had been sacrificed. Moreover, the results demonstrate, at weeks 22, 27 and 37, the presence of

25 soluble antiviral activity mediated by CD8+ T lymphocytes (CAF), measured as the ability of cell supernatants from monkeys CD8+ T lymphocytes to inhibit acute infection of the chimeric virus SHIV 89.6P in CEMx174 cells, or to control reactivation of HIV-1 chronic infection in OM-10-1 cells (Table 7). CAF activity was generally observed in vaccinated monkeys as compared to control animals.

TABLE 7

Analysis of the presence of soluble antiviral activity mediated by CD8+ T lymphocytes (CAF)^a

Monkey ID	Week after the primary immunization	% inhibition of viral replication	
		Acute infection	Chronic infection
M1	22	89.5	ND
	27	62	61.7
	37	ND	ND
M2	22	44	ND
	27	54	27
	37	48	53
M3	22	24	ND
	27	37	22
	37	75	23

- 5 ^a PBMC from monkeys vaccinated with 100 µg (M1) and 10 µg (M2) of recombinant Tat protein and from a control monkey (M3), that was not vaccinated, but had repeated skin tests with Tat were isolated by Ficoll density gradient. CD8+ T lymphocytes enriched cultures were isolated from PBMC by anti-CD8 magnetic beads (Dynabeads, Dynal, Norway) according to manufacturer's instructions. The
- 10 purity of the cultures was controlled by FACS analysis using a series of antibodies directed against specific cellular markers (CD3, CD4, CD8). CD8+ enriched cultures were seeded (in duplicate) at 5×10^5 cells/500 µl per well in 48-well plates, previously coated with an anti-CD3 monoclonal antibody (2.5 µg/ml, BioSource International, Camarillo, CA) for 12 hours at 4°C, and grown in RPMI
- 15 1640, containing 10% fetal bovine serum and IL-2 (20 U/ml). 250 µl of medium were collected every three days, for two weeks, and substituted with an equal volume of fresh medium. Cell supernatants were centrifuged, filtered (0.45 µm) and stored at -80°C. Cell supernatants derived from all time points, with the exception of the first one, were pooled and the presence of antiviral activity was
- 20 tested as their ability to inhibit viral replication in two systems, represented by acute and chronic infection, respectively. For the acute infection system, the CEM x 174 cell line was used, which derives from the human B cell line 721.174 fused with the human T cell line CEM (Ref. 143). Cells (2×10^5) were incubated in

polypropylene tubes with or without 200 μ l of CD8+ supernatants, prepared as described above, for 2 hours at 37°C. Cells were washed 3 times with fresh medium, seeded at 2×10^4 cells per well, in 96-well plates, and incubated in 200 μ l with (treated cells) or without (untreated cells) of different volumes (50 μ l, 5 μ l and 0.5 μ l) of culture supernatants derived from CD8+ T lymphocytes of monkeys injected with the vaccine or the control monkey. After infection, aliquots of culture supernatants were collected every three days and substituted with an equal volume of complete medium previously added with the CD8+ culture supernatant from vaccinated and control monkeys. The results shown in the Table correspond to day 7 after infection and are expressed as percentage (%) of inhibition of viral replication of cells treated with CD8+ culture supernatants derived from vaccinated monkeys as compared to untreated cells. Viral replication was determined by measuring the RT values, as described (Ref. 54), or the p27 Gag values by ELISA, in the cell supernatants collected at each time point. For the chronic infection system OM-10-1 cell line was used (Ref. 20, 21), which represents a human T lymphocytic line chronically infected by HIV-1. Cells were seeded (in duplicate) at 5×10^4 cells/200 μ l per well, in 96-well plates, in the presence of anti-TNF β antibodies (40 μ g/ml), with or without different volumes (50 μ l, 5 μ l, 0.5 μ l) of cell supernatant from CD8+ T lymphocytes derived from vaccinated or control monkeys. Cells were activated to proliferate by PMA (10^{-7} M). After 24 hours, aliquots of culture medium were collected to determine viral replication by measuring RT or p24 Gag levels by ELISA. The results are represented as % of inhibition of reactivation of infection in treated cells as compared to untreated cells. The results of acute and chronic infection shown in the Table refer to cells treated with 5 μ l of supernatant derived from CD8+ cell cultures. ND: not done.

Analysis of the delayed hypersensitivity (DTH) by means of a skin test showed that both the vaccinated (M1 and M2) and control (M3) monkeys were negative (Table 8).

TABLE 8
Skin-test to Tat^a

Weeks after the primary immunization	Monkeys		
	M1	M2	M3
10	-	-	-
15	-	-	-
22	-	-	-
27	-	-	-
32	-	-	-
37	-	-	-

^aTat (1 and 5 µg) in 150 µl of PBS-0.1% BSA or the buffer alone were inoculated by the intradermal route in a dorsal area previously shaved of the vaccinated and control (control of specificity of the response) monkeys, at weeks 10, 15, 22, 27, 32 and 37 following the first immunization. Monkeys M1 and M2 were vaccinated with recombinant Tat protein (100 µg and 10 µg, respectively) in 250 µl of autologous serum and 250 µl of RIBI, injected by the subcutaneous route in one site. Monkey M3 is a control monkey that has not been vaccinated. The appearance of a nodular erythema after 48-72 hours was suggestive of a delayed hypersensitivity reaction (DTH): ++, Ø ≥ 5 mm; +, Ø ≥ 1-4 mm; +/-, erythema without hardening; -, Ø < 1 mm.

The results of this pilot experiment indicate that Tat recombinant protein, produced and purified according to a protocol described by us, was not toxic at the doses of 100 and 10 µg administered by the subcutaneous route. In addition, Tat protein elicited a specific and broad immune response with antiviral activities, both humoral and cell-mediated. A stronger and specific anti-Tat immune response was observed in monkey M2, vaccinated with 10 µg of recombinant protein. Moreover, the RIBI adjuvant did not show any apparent sign of toxicity in the vaccinated monkeys. Based on these results, a second pilot experiment was designed in order to determine the effects of immunization with 10 µg of Tat combined with RIBI or Alum adjuvants. Monkeys were injected by the subcutaneous route in one site according to the following schedule. Monkey M1-3: 10 µg of recombinant Tat protein in 250 µl of autologous serum and 250 µl of RIBI. Monkeys M4-6: 10 µg of recombinant Tat protein in 250 µl of autologous serum and 250 µl of Alum. Monkey M7: RIBI

250 µl and 250 µl of autologous serum (control monkey). Monkey M8: Alum 250 µl and 250 µl of autologous serum (control monkey). Ten ml of blood were withdrawn from each monkey at day -9 preceding the first immunization in order to carry out the exams described in the previous pilot experiment and to determine the basal parameters of each animal. Monkeys were inoculated at time 0 and after 2, 6, 11, 15, 21, 28 and 32 weeks. At week 36 monkeys M1-6 received the last boost with recombinant Tat protein (16 µg) in 200 µl of ISCOM (immune stimulating complex) and 300 µl of PBS. ISCOM is an adjuvant consisting of quil A saponin, cholesterol and phospholipids which increases humoral and cell-mediated immune response (Ref. 109, 90). Monkeys M7 and M8 were injected at the same time points only with adjuvants. At each vaccination point and at weeks 40, 44 and 50, 10 ml of blood were withdrawn from the animals to analyze the clinical and immunological parameters described in the previous pilot experiment. Moreover, urine samples and vaginal swabs were collected to analyze the presence of Tat specific secretory IgA. In order to evaluate the protective effect of Tat immunization against the infection, vaccinated and control monkeys were challenged with the chimeric "simian/human immunodeficiency virus" (SHIV), strain 89.6P, containing the HIV-1 *tat* gene, previously grown and titered in *Macaca fascicularis* (Ref. 128, 129, 69). After challenge, animals were monitored (every two weeks for the first month, every four weeks for the next three months and every 8 weeks up to 6-12 months) for virological parameters, such as plasma p27 antigenemia and plasma and cellular viral load. To confirm that infection had occurred, anti-SIV antibodies were also searched by means of a commercial kit used for the detection of anti-HIV-2 antibodies which recognizes also anti-SIV antibodies (Elavia Ac-Ab-Ak II kit, Diagnostic Pasteur, Paris, France).

At present, the results of the second pilot experiments are as follows. No alterations of the chemo-physical, haematological and behavioristic parameters were observed. Monkeys did not show any inflammatory or neovascularization sign at the site of inoculation. A specific antibody response (IgM, IgG) was observed. At week 15 anti-Tat antibody (IgG) titers reached high levels, ranging from 1:6400 to 1:25600 (figures 5-7). The antibodies essentially reacted with the

amino-terminal region (aa 1-20) of Tat, with titers ranging from 1:1600 to 1:3200 (figure 8) as shown at week 22. Moreover, antibodies directed against aa 46-60 of Tat, with titers ranging from 1:100 to 1:200, were also detected (figure 8). The ability of the monkeys' plasma to neutralize Tat activity was tested by assaying the inhibition of viral rescue in HLM-1 cells incubated with serial amounts of exogenous Tat, as previously described in the first pilot experiment. The results of these experiments have shown that immune plasma (diluted 1:2) from monkeys M1-6 at week 15 blocked viral replication induced by 30 ng/ml of exogenous Tat, as determined by the measurement of p24 antigen released into the culture medium. Conversely, the preimmune plasma of monkeys M1-6 or plasma from control monkeys (M7, M8) did not block Tat activity (Table 9). Moreover, immune plasma (diluted 1:2) of monkeys M1-6, withdrawn at week 21, blocked virus replication induced by 60 ng/ml, 120 ng/ml, 240 ng/ml and 500 ng/ml of exogenous Tat. In particular, these plasma determined a 10-fold reduction of virus replication induced by very high doses of extracellular Tat (240 ng/ml and 500 ng/ml) (Table 9).

TABLE 9

Neutralizing activity of immune plasma on the rescue of virus replication induced by extracellular Tat^a

Samples	Inhibition (%)
Tat (30 ng/ml)+ Preimmune M1	0
Tat (30 ng/ml)+ Preimmune M2	0
Tat (30 ng/ml)+ Preimmune M3	0
Tat (30 ng/ml)+ Preimmune M4	0
Tat (30 ng/ml)+ Preimmune M5	0
Tat (30 ng/ml)+ Preimmune M6	0
Tat (30 ng/ml)+ Immune M1 (week 15)	89.8
Tat (30 ng/ml)+ Immune M2 (week 15)	78.7
Tat (30 ng/ml)+ Immune M3 (week 15)	100
Tat (30 ng/ml)+ Immune M4 (week 15)	100
Tat (30 ng/ml)+ Immune M5 (week 15)	70.8
Tat (30 ng/ml)+ Immune M6 (week 15)	94.2
Tat (60 ng/ml)+ Preimmune M1	0
Tat (60 ng/ml)+ Preimmune M2	0
Tat (60 ng/ml)+ Preimmune M3	0
Tat (60 ng/ml)+ Preimmune M4	0
Tat (60 ng/ml)+ Preimmune M5	0
Tat (60 ng/ml)+ Preimmune M6	0
Tat (60 ng/ml)+ Immune M1 (week 21)	96.3
Tat (60 ng/ml)+ Immune M2 (week 21)	100
Tat (60 ng/ml)+ Immune M3 (week 21)	100
Tat (60 ng/ml)+ Immune M4 (week 21)	98.7
Tat (60 ng/ml)+ Immune M5 (week 21)	99
Tat (60 ng/ml)+ Immune M6 (week 21)	98.8
Tat (120 ng/ml)+ Pool preimmune M1-6	0
Tat (120 ng/ml)+ Immune M1 (week 21)	59.2
Tat (120 ng/ml)+ Immune M2 (week 21)	90.4
Tat (120 ng/ml)+ Immune M3 (week 21)	96.8
Tat (120 ng/ml)+ Immune M4 (week 21)	98.3
Tat (120 ng/ml)+ Immune M5 (week 21)	100
Tat (120 ng/ml)+ Immune M6 (week 21)	97.8
Tat (240 ng/ml)+ Pool preimmune M1-6	0
Tat (240 ng/ml)+ Immune M1 (week 21)	26.1
Tat (240 ng/ml)+ Immune M2 (week 21)	49.4
Tat (240 ng/ml)+ Immune M3 (week 21)	70.3
Tat (240 ng/ml)+ Immune M4 (week 21)	91.2
Tat (240 ng/ml)+ Immune M5 (week 21)	94.5
Tat (240 ng/ml)+ Immune M6 (week 21)	86
Tat (500 ng/ml)+ Pool preimmune M1-6	0

Samples	Inhibition (%)
Tat (500 ng/ml)+ Immune M1 (week 21)	32.7
Tat (500 ng/ml)+ Immune M2 (week 21)	38.9
Tat (500 ng/ml)+ Immune M3 (week 21)	57.5
Tat (500 ng/ml)+ Immune M4 (week 21)	89.4
Tat (500 ng/ml)+ Immune M5 (week 21)	72
Tat (500 ng/ml)+ Immune M6 (week 21)	71.8

^a The ability of anti-Tat plasma to neutralize Tat activity was determined in HLM-1 cells, as described in legend to Table 4. Recombinant Tat protein (30 ng/ml, 60 ng/ml, 120 ng/ml, 240 ng/ml and 500 ng/ml) was added alone or together with an equal volume of monkey preimmune plasma or at week 15 or 21 (immune plasma). Monkeys M1-3 were vaccinated with 10 µg of Tat in 250 µl of autologous serum and 250 µl of RIBI; monkeys M4-6 were vaccinated with 10 µg of Tat in 250 µl of autologous serum and 250 µl of Alum; two control monkeys were injected with RIBI (250 µl and 250 µl of autologous serum) (M7) or with Alum (250 µl and 250 µl of autologous serum) (M8). The results are represented as described in legend to Table 4.

The ability of monkey plasma to neutralize the activity of extracellular Tat released by the cells during acute infection was tested in CEM x 174 cells infected with the chimeric virus SHIV 89.6P. At day 7 after infection virus replication was observed in 50% of control cells infected with SHIV and cultivated with the preimmune plasma of monkeys M1-6. Conversely, virus replication was not detected in infected cells that were grown in the presence of the immune plasma from monkeys M1-6 withdrawn at week 44 (Table 10).

TABLE 10

Neutralizing activity of immune plasma on transmission of virus infection ^a

Sample	p27 (pg/ml)
SHIV + Preimmune M1	Neg
SHIV + Preimmune M2	Neg
SHIV + Preimmune M3	1.080
SHIV + Preimmune M4	0.602
SHIV + Preimmune M5	1.169
SHIV + Preimmune M6	Neg
SHIV + Immune M1	Neg
SHIV + Immune M2	Neg
SHIV + Immune M3	Neg
SHIV + Immune M4	Neg
SHIV + Immune M5	Neg
SHIV + Immune M6	Neg

^a CEM x 174 cells (3×10^4 cells/150 μ l) in 96-well plates were infected with the chimeric SHIV 89.6P virus (5×10^5 TCID₅₀/cell) for 2 hours at 37°C in RPMI 1640 containing 10% FCS. Cells were washed twice with RPMI 1640 and resuspended in 150 μ l of complete medium added with 5% of the monkey preimmune plasma or immune plasma (week 44) from animals vaccinated with recombinant Tat (10 μ g) and RIBI (M1-3) or Alum (M4-6). Animal plasma were previously heated at 56° for 30 min. and analyzed by ELISA to control anti-Tat antibody titers. Each serum was tested in duplicate. At days 3, 5 and 7 after infection 120 μ l of culture medium were collected and substituted with an equal volume of fresh medium containing 5% of preimmune or immune plasma from monkeys M1-6. The ability of the plasma to neutralize extracellular Tat, released during acute infection, and to control the transmission of infection in vitro was determined by detecting the viral Gag p27 in the culture medium by ELISA (Coulter International, Miami, FL). The results, represented as p27 values (pg/ml), correspond to the mean value of two wells for each serum at day 7 after infection.

Moreover, a proliferative response to Tat was observed since week 11 (Table 11).

TABLE 11

Proliferative response to Tat^a

Monkey	Stimulus	Weeks from primary immunization									
		0	11	15	21	28	32	36	40	44	50
M1	PHA	16.96	10.50	15.27	33.8	7.2	51.5	64.3	36.05	24	65.7
	TT	11.69	1.96	3.01	1.2	1.2	1.3	0.93	1.4	10.05	7.2
	Tat	1.12	1.55	0.52	1.7	0.8	0.8	0.6	0.7	9.27	4.7
M2	PHA	31.27	25.75	21.28	87.1	25.7	56	38.2	40.3	29.03	26
	TT	1.12	1.8	0.57	1.7	1.15	1.6	4.95	1.2	1.51	2.9
	Tat	1.08	3.65	6.22	14.14	3.5	1.8	4.1	1.9	7.67	13.2
M3	PHA	22.42	7.89	16.88	36.3	148.5	42	78.9	27	53.71	ND
	TT	11.43	0.95	1.71	1.25	1.2	1.1	1	1	1.81	ND
	Tat	1.65	2.69	18.82	23.51	12.03	0.9	1.3	0.5	23.85	ND
M4	PHA	3.88	20.77	15.22	83.7	18.6	35	38.2	45.2	57.47	15.8
	TT	2.85	4.49	9.07	6.9	15.8	3.7	3.8	5	19.77	6.6
	Tat	1.29	3.01	3.24	7.9	10.1	2.6	1.5	3.9	33.61	4.7
M5	PHA	6.25	5.74	16.74	72.2	7.45	41	56.5	32.9	33.85	12
	TT	2.31	1.07	4.84	3.9	0.9	0.83	1.4	1.24	10.22	1.95
	Tat	1.80	0.66	1.76	3.6	2.22	0.8	1.14	1.3	1.33	1.4
M6	PHA	11.96	17.94	2.77	29.4	7.3	25	8.3	6.85	18.01	5.2
	TT	4.14	1.71	0.13	1.7	10.34	1.3	1.8	1.1	2.49	0.9
	Tat	1.37	1.06	0.11	2.95	9.3	1.13	1.3	1	5.8	0.3
M7	PHA	21.65	20.30	37.93	17.6	17.9	75	12.9	34.8	41.81	27.5
	TT	0.97	0.80	0.88	1	0.6	1.04	0.6	0.4	1.11	1.1
	Tat	1.78	0.68	0.73	1	0.42	0.9	0.5	0.8	1.07	0.4
M8	PHA	26.51	67.09	16.38	14.9	17.2	28.2	18.95	20.6	28.61	13.6
	TT	1.20	10.78	0.20	1.6	0.62	0.8	1.2	0.9	1.11	2.1
	Tat	1.12	0.00	0.21	1.03	0.57	0.6	0.5	0.9	1.04	1

^a Peripheral blood lymphocytes were isolated, activated with PHA (4 µg/ml), the tetanus toxoid (TT) (10 µg/ml) and Tat (5 µg/ml) and assayed as described in legend to Table 5. Monkeys M1-3 were inoculated with 10 µg of recombinant Tat protein in 250 µl of autologous serum and 250 µl of RIBI; monkeys M4-6 were
5 inoculated with 10 µg of recombinant Tat in 250 µl of autologous serum and 250 µl of Alum; two control monkeys were inoculated with RIBI (250 µl and 250 µl of autologous serum) (M7) and with Alum (250 µl and 250 µl of autologous serum) (M8). ND, not done.

A strong cytotoxic T cell response (CTL) was detected in one monkey vaccinated
10 with the Tat protein and RIBI (M1) and in two monkeys vaccinated with the Tat protein and Alum (M4 and M5), whereas a weaker CTL response was observed in monkey M6 immunized with Tat and Alum (figure 9 and Table 12).

TABLE 12
Analysis of CTL response

Monkey	Week	Target: Effector ratio						CTL activity
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Average	
M1	28	5.9	4.7	4.1	7.9	5.3	5.5	+
	36	ND	14.4	8.8	4.9	6.7	8.7	+
M2	28	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M3	28	0	0	0	0	0	0	-
	36	ND	0	0.6	0.5	2.0	0.7	-
M4	28	0	0	1.1	1.1	2.6	0.9	-
	36	ND	2.7	8.3	15	1.9	6.9	+
M5	28	4.9	3.9	4.7	5.5	1.7	4.1	+
	36	0	1	0	0	0	0.2	-
M6	28	0	2.6	1.1	7.2	7.2	3.6	+/-
	36	ND	0	0	0	0	0	-
M7	36	0	0	0	0	0	0	-
M8	36	0	0	0	0	0	0	-

- ^a The assay was performed as described in Table 6. Monkeys M1-3 were immunized with 10 μg of recombinant Tat in 250 μl of autologous serum and 250 μl of RIBI; monkeys M4-6 were inoculated with 10 μg of recombinant Tat in 250 μl of autologous serum and 250 μl of Alum; two control monkeys were inoculated with RIBI (250 μl and 250 μl of autologous serum) (M7) and Alum (250 μl and 250 μl of autologous serum) (M8). ND, not done.
- At week 44, the presence of total antiviral activity (TAA) was determined. TAA was measured as the ability of PBMC from monkeys vaccinated with recombinant Tat protein, cultured in the presence of autologous serum, to be resistant to SHIV 89.6P infection (Table 13).

TABLE 13

Analysis of the presence of total antiviral activity (TAA)^a

Monkey ID	Days after infection	
	7	17
	Minimum infectious dose (TCID ₅₀ /cell)	Minimum infectious dose (TCID ₅₀ /cell)
M1	10 ⁻²	10 ⁻²
M2	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
M3	10 ⁻³	10 ⁻³
M4	10 ⁻²	10 ⁻²
M5	10 ⁻²	10 ⁻²
M6	10 ⁻³	10 ⁻³
M7	10 ⁻³	10 ⁻³
M8	10 ⁻⁴	10 ⁻³

^a PBMC were collected at week 44 from monkeys vaccinated with the recombinant Tat protein (10 µg) and RIBI (M1-3) or Alum (M4-6) and from control monkeys inoculated with RIBI (M7) or Alum (M8). PBMC, purified by Ficoll gradient and seeded in triplicate at $5 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ per well in 48-well plates, were grown in RPMI 1640 containing 10% FCS and 5% of autologous plasma previously heated at 56°C for 30 min., in the presence of an anti-CD3 monoclonal antibody (5ng/ml) and IL-2 (2 U/ml), for 48-72 hours at 37°C. Cells were infected with serial dilutions of the chimeric virus SHIV 89.6P (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ TCID₅₀/cell) for 2 hours at 37°C, washed 3 times with PBS-A and resuspended in 50% of conditioned medium and 50% of fresh medium at 5×10^5 cells/ml/well. At days 3, 7, 10, 14 and 17 after infection, aliquots of culture medium were collected and substituted with equal volumes of fresh medium. Virus replication was determined in cell supernatants by p27 Gag ELISA (Coulter International, Miami, FL). The results are shown as the minimum infectious dose of SHIV (TCID₅₀/cell) at days 7 and 17 after infection able to infect monkey lymphocytes.

The results demonstrate the presence of soluble antiviral activity mediated by CD8+ T lymphocytes (CAF) (Table 14). An overall increase of CAF activity was observed in vaccinated monkeys as compared to control animals.

TABLE 14

Analysis of the presence of soluble antiviral activity mediated by CD8+ T lymphocytes (CAF)^a

Monkey ID	Weeks after the primary immunization	% inhibition of viral replication	
		Acute infection	Chronic infection
M1	0	8	30
	32	53	53
M2	0	36	0
	32	60	27
M3	0	0	37
	32	55	29
M4	0	45	0
	32	85	66
M5	0	41	0
	32	ND	ND
M6	0	49	18
	32	34	41.4
M7	0	39	39
	32	71	44
M8	0	37	0
	32	76	26.8

- ^a Analysis of the presence of soluble antiviral activity mediated by CD8+ T lymphocytes (CAF) from monkeys vaccinated with recombinant Tat protein (10 µg) and RIBI (M1-3) or Alum (M4-6), and from control monkeys inoculated with RIBI (M7) or Alum (M8). Acute infection was tested on CEM x 174 cells infected with SHIV 89.6P. The assay was performed as described in Table 7 and the results refer to day 7 after infection. The presence of CAF on the chronic infection system was tested in the U1 cell line (Ref. 47), which is a promonocytic human cell line chronically infected by HIV-1. U1 cells, seeded at 1×10^4 cells/200 µl per well in 96-well plates, were incubated with PMA (10^{-8} M) to induce reactivation of HIV-1 infection, with or without different volumes (50 µl, 5 µl, 0.5 µl) of culture supernatants from CD8+ T lymphocytes derived from vaccinated and control monkeys. Three days after PMA treatment, the presence of HIV-1 in the culture medium was determined by RT assay or p24 Gag ELISA. The results are shown as % of inhibition of HIV-1 replication in cells treated with CD8+ T cells supernatants compared to untreated cells. The results of inhibition of acute and chronic infection refer to cells treated with 5 µl of CD8+ supernatants.

The production of cytokines (γ IFN, IL-4, TNF α) and of the RANTES chemokine from PBMC of monkeys vaccinated with Tat and RIBI (M1-3) or Tat and Alum (M4-6) and control monkeys M7 and M8 was also determined (Table 15).

TABLE 15
Analysis of cytokine and chemokine production

Monkey	Control				PHA				TT			
	γ IFN	IL-4	TNF α	RANTES	γ IFN	IL-4	TNF α	RANTES	γ IFN	IL-4	TNF α	RANTES
M1	-/-	-/-	-/-	-/-	988/1096	-/-	948/-	1788/2564	-/-	-3.8	-/-	Nd/Nd
M2	-/-	-/-	126/-	-/-	325/280	-/-	244/172	292/284	86/66	-/-	-/-	Nd/Nd
M3	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd
M4	-/-	-/-	-/-	-/-	426/66	-/-	98/-	-284	-/-	-/-	-224	Nd/Nd
M5	-/-	-/-	48/-	-/-	279/303	-/-	416/-	536/608	-/-	-/-	-/-	Nd/Nd
M6	-/-	-/-	-/-	246/-	255/137	-/-	-/-	1124/268	-/-	-/-	-266	Nd/Nd
M7	-/-	-/-	-/-	-/-	150/169	-/-	40/-	1228/976	-/-	-4	-nd	Nd/Nd
M8	-/-	-/-	-/-	-/-	0/0	20/32	60/-	2160/1588	-/-	-/-	-nd	Nd/Nd

Monkey	Tat (1 µg)				Tat (5 µg)			
	γIFN	IL-4	TNFα	RANTES	γIFN	IL-4	TNFα	RANTES
M1	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	16/-	-/-
M2	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
M3	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd	Nd/Nd
M4	-/-	-/-	378/430	-/-	-/-	-/-	344/352	-/-
M5	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
M6	-/-	-/-	-/-	-/-	-78	-/-	150/-	-/-
M7	-/40	-/3.3	84/-	-/-	-/-	-/3.2	-/-	-/-
M8	-/-	-/4.8	-/-	-/-	-/-	-/10	-/-	726/528

^a Analysis of the production of cytokines and chemokines after 48 and 96 hours of culture (48/96) from PBMC of monkeys vaccinated with 10 µg of Tat and RIBI (M1-3) or Alum (M4-6). Control monkeys (M7 and M8) were inoculated with RIBI or Alum adjuvants, respectively. PBMC, withdrawn at week 44 and purified by Ficoll gradient, were seeded at 1×10^6 cells/ml per well in 24-well plates and grown in RPMI 1640 containing 10% FCS. PBMC were unstimulated (control), to evaluate the spontaneous release of cytokines and chemokines, or stimulated with PHA (2 µg/ml), the tetanus toxoid (TT, 5 µg/ml) or Tat (1 or 5 µg/ml). Aliquots of culture supernatants were collected 48 and 96 hours following stimulation to determine the presence of cytokines and chemokines, by means of commercial ELISA kits from BioSource International (Camarillo, CA, USA) to assay cytokines production, and from R&D Systems (Abdington, Oxon, UK) to evaluate RANTES production. The results are shown as pg/ml at 48 and 96 hours of culture (48/96), respectively. Cut-off values were (pg/ml): γ IFN, 31.2; IL-4, 3.12; TNF α , 15.6; RANTES, 6.25. (-), values were lower than corresponding cut-off values. Nd: not done.

Moreover, at week 15 five monkeys vaccinated with the recombinant protein (M2-6), showed a positive reaction to the skin test to Tat, with a strong delayed hypersensitivity reaction (Table 16 and figure 19). In monkeys 4 and 5 the skin test reaction was even stronger in the following weeks (Table 16).

TABLE 16

Skin-test to Tat^a

Monkey	Weeks from the primary immunization						
	11	15	21	28	32	36	44
M1	-	-	-	-	-	-	-
M2	-	+	+	+/-	+/-	+	+/-
M3	+/-	+	+/-	+/-	-	-	-
M4	-	+	++	++	++	++	++
M5	+/-	+	++	+	++	++	+
M6	-	+	+/-	+/-	-	-	-
M7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

- ^aTat (1 and 5 µg) in 150 µl of PBS-0.1% BSA or the buffer alone were inoculated by the intradermal route in a shaved area of the back of vaccinated monkeys. Control animals were not inoculated (ND, not done) at weeks 11, 15, 21, 28, 32, 36 and 44 after the first immunization. Monkeys M1-3 were vaccinated with 10 µg of recombinant Tat protein in 250 µl of autologous and 250 µl of RIBI; monkeys M4-6 were vaccinated with 10 µg of recombinant Tat protein in 250 µl of autologous serum and 250 µl of Alum; two control monkeys were inoculated with RIBI (250 µl and 250 µl of autologous serum) (M7) or Alum (250 µl and 250 µl of autologous serum) (M8). The presence of an erythematous nodule after 48-72 hours was suggestive of a delayed hypersensitivity reaction (DTH): ++, Ø ≥ 5 mm; +, Ø ≥ 1-4 mm; +/-, erythema without hardening; -, Ø < 1 mm.
- The post-challenge results indicate that 4/6 (67%) vaccinated monkeys were protected against infection with 10 MID₅₀ of SHIV 89.6P, as shown by the results of the virological assays (Table 17). Particularly, p27 Gag antigen was not detected in plasma of monkeys M1, M2, M4 and M6, proviral DNA was not found by PCR in lymphocytes from these monkeys and cytoviremia was negative. Monkeys M3 and M5 were infected as shown by the presence of p27 Gag antigen in the plasma, by detection of proviral DNA in the cells and by a positive cytoviremia (Table 17). Both controls (M7 and M8) resulted infected, based on the same virological assays. To further control the infectivity of the viral dose used for the challenge, another naive monkey (M13) was added to the control animals and infected with 2.85 MID₅₀ of SHIV 89.6P (corresponding to a dose of virus 3.5-fold lower than the dose used for the challenge of the animals in the protocol). Monkey

M13 resulted to be infected based on all the virological assays. To confirm that the animals were exposed to the virus, the presence of antibodies against SIV antigens, encoded by the chimeric SHIV 89.6P virus (Gag, Pol, RT, Nef), was analyzed as already described in this Example. The presence of anti-SIV antibodies in the monkeys that were negative for the virological parameters (M1, M2, M4 and M6) confirm that these animals were exposed to the virus and indicates that an abortive infection of SHIV had occurred in these monkeys. Monkeys that showed low anti-SIV antibody titers were studied for in vitro production of specific antiviral IgG (IVAP) (Ref. 177, 178) according to the following method. PBMC (2×10^6 /well) were seeded in 24-well plates and stimulated with PWM (2 μ g/ml, Sigma, St. Louis, USA). Following 7 days incubation (at 37°C in the presence of 5% CO₂ and 95% humidity) culture supernatants were collected to assay for anti-HIV antibody production by an Elisa commercial kit for the detection of HIV-1 and HIV-2 antibodies (Abbott, HIV-1/HIV-2 EIA Third Generation Plus). All challenged monkeys resulted positive for the production of anti-HIV Env antibodies, since HIV-1 Env is present in the SHIV 89.6P.

TABLE 17
Analysis of virological parameters

Monkey	Days after challenge with SHIV89.6P											
	15				30				60			
	p27 ^a (pg/ml)	DNA PCR (copies/ µg) ^b	Cytoviremia ^c	anti-SIV IgG ^d	p27 (pg/ml)	DNA PCR (copies/ µg)	Cytoviremia	anti-SIV IgG	p27 (pg/ml)	DNA PCR (copies/ µg)	Cytoviremia	anti-SIV IgG
M1	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2
M2	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2
M3	73.3	855	707.3	Neg	26.22	959	74.95	Neg	<20	71	<1	1:10
M4	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:10
M5	964	1147	>2818.3	Neg	20.8	>10 ⁴	78	1:2	<20	65	44.6	1:10
M6	<20	<1	Neg	1:8	<20	<1	Neg	1:8	<20	<1	Neg	1:6
M7	287.8	838	707.9	>1:50	65.2	858	354.8	>1:50	<20	439	11.2	1:6400
M8	106.7	376	707.9	1:2	<20	311	44.6	1:5	<20	56	2.8	1:6400
M13	1876	+	+	ND	<20	+	ND	1:1600	<20	43	ND	1:3200

Analysis of the virological parameters after challenge of monkeys vaccinated with 10 µg of recombinant Tat protein and RIBI (M1-3) or Alum (M4-6). Control monkeys (M7 and M8) were inoculated with RIBI or Alum, respectively. Monkey M13 was a naive animal infected with 2.85 MID₅₀ of SHIV 89.6P.

5 ^aThe plasma antigenemia was evaluated by p27 Gag ELISA (Innogenetics, Belgium) and it is expressed as p27 values (pg/ml). Neg, the value was lower than the corresponding cut-off value (18 pg/ml).

^bDNA was purified by whole blood using the QIAamp blood kit (Angiogen GmbH and Qiagen Inc., Hilden, Germany). The quality of the DNA was controlled by PCR
10 amplification of the β-globin gene, as previously described (Ref. 141). The presence of proviral DNA was analyzed by semiquantitative PCR amplification of SIV gag. PCR was performed on 1 µg of cellular DNA using primers SG1096Ngag (corresponding at nucleotides 1096-1119 on SIVmac251 genome: 5'TTAGGCTACGACCCGGCGGAAAGA3') and SG1592CgagD (mapping at
15 nucleotides 1569-1592 of SIVmac251 genome: 5'ATAGGGGGTGCAGCCTTCTGACAG3') which amplify a 496 base pair fragment of the SHIV gag gene, as described (Ref.153). To quantify the number of copies of proviral DNA, in each experiment a standard curve was prepared using the plasmid pCMRII-Δgag (containing a 100 base pair deletion in the gag gene of
20 SIVmac251) as a template DNA and the primers described above that amplify a 396 base pair DNA fragment. PCR products were analyzed by electrophoresis and quantified by densitometric analysis (Ultrascan LX Enhancer Laser, LKB, Bromma, Sweden). The relationship between the OD values and the number of molecules of the Δgag plasmid was correlated by means of linear regression
25 analysis (Statgraphics, Manugistics, Inc. Cambridge, MA). The OD values were linear up to 1000 molecules (coefficient of correlation = 0.954± 0.026). The number of copies of SHIV proviral DNA/µg of cellular DNA was determined interpolating the OD values of each sample to the standard curve. The sensitivity of the assay was 1 copy of provirus/µg of DNA.

^cCytoviremia was determined in co-cultivation assays. To this aim 1×10^4 CEM x 174 cells were cultivated in the presence of serial dilutions of CD-8 depleted PBMC under study (a total of 12 dilutions, from 1×10^6 to 3.9×10^3 cells per well) in 96-well plates. At days 3, 7 and 10 after infection, $150 \mu\text{l}$ were removed to assay the presence of p27 Gag by ELISA (Innogenetics, Belgium) and substituted with an equal volume of fresh medium. The results were analyzed by means of the Reed and Muench formula to determine the number of productively infected PBMC per million of total cells.

^dThe presence of antibodies against SHIV was determined on serial dilutions of animal plasma tested in duplicate using the Elavia Ac-Ab-Ak II kit (Diagnostic Pasteur, Paris, France), according to the manufacturer's instructions. The highest dilution at which plasma values were higher than the cut-off value is shown.

^eVirus isolation was performed, instead of cytoviremia, for monkey M13. To this aim PBMC (3×10^6) from monkeys infected with different doses of SHIV 89.6P, purified by Ficoll, were cultivated with CEM x 174 cells (1×10^6) in 1 ml of medium containing 10% FCS. After 24 hours, cells were diluted at $1 \times 10^6/\text{ml}$ and cultivated for three days. Two ml of medium were then collected and cells were re-seeded at $3 \times 10^5/\text{ml}$ in 7 ml. The excess of cells was discarded. This procedure was repeated twice a week for 4 weeks. The presence of virus was determined by p27 Gag ELISA (Innogenetics, Belgium) and then by RT assay. Virus isolation was considered positive (+) when both assays (p27 and RT) were positive in 3 sequential samples.

Conversely, virus isolation was considered negative (-).

^fA qualitative DNA-PCR was performed for monkey M13.

The virological data overlap the absolute number of CD4 lymphocytes that resulted dramatically reduced in infected monkeys (M3, M5, M7, M8) and high and stable in the virus-negative animals (M1, M2, M4, M6) as shown in Table 18.

TABLE 18
FACS analysis of CD4+ and CD8+ lymphocytes^a

Monkey	Days post challenge with SHIV89.6P											
	0			15			30			60		
	%			%			%			%		
	(cells/ μ l)			(cells/ μ l)			(cells/ μ l)			(cells/ μ l)		
	CD4+	CD8+	CD4+/ CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/ CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/ CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/ CD8+
M1	32.1 (1490)	53 (2460)	0.6	ND	ND	ND	30.8 (2420)	57.3 (4500)	0.54	30.6 (2460)	57.9 (4670)	0.53
M2	27.7 (1550)	45.3 (2530)	0.6	ND	ND	ND	35.5 (2120)	43.7 (2610)	0.81	29.6 (2000)	42.4 (2870)	0.7
M3	33 (1120)	39.3 (1340)	0.84	ND	ND	ND	3.1 (190)	75.6 (4660)	0.04	6.2 (240)	70 (2750)	0.09
M4	16.6 (670)	68.3 (2740)	0.24	ND	ND	ND	17.25 (2050)	68.7 (8180)	0.25	15.5 (1520)	75 (7350)	0.21
M5	36.3 (2770)	43.9 (3350)	0.83	ND	ND	ND	1.1 (90)	82.3 (1300)	0.01	4.1 (480)	75.5 (8730)	0.05
M6	35.3 (1210)	43.4 (1490)	0.81	ND	ND	ND	35.9 (1240)	45.5 (1570)	0.79	37.8 (3700)	43.7 (4280)	0.86
M7	36.1 (1610)	31.3 (1400)	1.15	ND	ND	ND	7.4 (480)	66.1 (4260)	0.11	13.7 (860)	56.7 (3550)	0.24
M8	25.7 (850)	51.3 (1710)	0.5	ND	ND	ND	3.3 (210)	76.2 (4840)	0.04	8.1 (590)	64.9 (4670)	0.13
M13	40.5 (2590)	39.7 (2544)	1.01	38.4 (434)	33.6 (380)	1.14	35.1 (1721)	32.2 (1479)	1.16	3.1 (111)	62.3 (2225)	0.05

^aFACS analysis of CD4+ and CD8+ lymphocytes from monkeys vaccinated with 10 µg of recombinant Tat protein and RIBI (M1-3) or Alum (M4-6). Control monkeys (M7 and M8) were inoculated only with RIBI or Alum adjuvants, respectively. Monkey M13 was a naive animal infected with 2.85 MID₅₀ of SHIV 89.6P. Analysis was performed by fluorescence-activated-cell-sorter (FACS) as described (Ref. 137), using labeled-monoclonal antibodies (anti-CD4-FITC, BioSource; anti-CD8-PerCp, Becton-Dickinson). ND, not done.

The results before the challenge indicate that Tat as the immunogen, as well as RIBI and Alum as the adjuvants (or ISCOM that was used as adjuvant in the last boost), were well tolerated by the animals and were non-toxic, confirming the results of safety and tolerability of the immunization with Tat obtained in the first pilot experiment. Moreover, these data confirm the observations of the first pilot experiment, supporting additional evidence to the fact that the recombinant Tat protein elicits a strong humoral and cellular response specific to Tat with antiviral effects *in vitro* and *in vivo*. The post-challenge results (4/6 protected monkeys) confirm the expectation of the *in vitro* results and indicate that an anti-Tat vaccine induces protection against infection and therefore against the disease. The follow-up of the two vaccinated and infected monkeys will clarify the effects of the vaccination on disease progression.

Example 5. Inoculation in *Macaca fascicularis* of an anti-Tat DNA vaccine: analysis of safety, tolerability, specific immune response and efficacy of protection against viral challenge.

It is proposed the direct inoculation of DNA of the plasmid pCV-Tat, containing the cDNA of the *tat* gene, and of the plasmid pCV0 as control DNA. Plasmid DNAs to be administered to animals are amplified in *E. Coli* (strain DH5) according to standard procedures (Ref. 110) and to protocols established by the "European Agency for the evaluation of medical products; Human Medicine Evaluation Unit" (Technical Report Series No. 17 January 1997), purified by two CsCl gradients and dialyzed for 48-72 hours against 100 volumes of PBS. DNA are then checked by restriction enzyme digestion. The functionality of the plasmid DNA is controlled by transfection of 5-10 µg of DNA using calcium-phosphate techniques (Ref. 110)

in H3T1 cells (1×10^6), which contain an integrated copy of the reporter plasmid HIV-1 LTR-CAT, and, 48 hours later, by the analysis of CAT activity (Ref. 55). The tolerability, the safety, the ability to elicit a specific immune response (both humoral and cellular) and the efficacy of protection against the virus challenge following immunization with pCV-Tat plasmid DNA were evaluated in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). In a first pilot experiment, three monkeys were immunized according to the following schedule: monkey M1 was inoculated with 200 μ g of pCV-Tat in 300 μ l of PBS by the i.d. route in 2 sites of the back, near the axillary lymph nodes (150 μ l/site); monkey M2 was inoculated with 500 μ g of pCV-Tat in 500 μ l of PBS by the i.m. route in 2 sites of the back (250 μ l/site). At days 1 or 5 before the i.m. inoculation, 250 μ l of physiological solution, containing 0.5% bupivacaine and 0.1% methylparaben, were injected in the two sites, previously marked, where plasmid DNA had to be inoculated. This was performed in order to increase the uptake and expression of DNA in the muscle (Ref. 37, 45). Monkey M3 was not inoculated and was used as a control animal. However, starting from week 10, this monkey was inoculated with 6 μ g (5 + 1 μ g) i.d. of Tat as a control for skin tests. Ten ml of blood were withdrawn from all monkeys 42 and 35 days preceding the first inoculation for analysis of basal parameters. Monkeys were inoculated at time 0 and after 5, 10, 15, 22, 27, 32 and 37 weeks. Finally, at week 42, animals received the last boost with recombinant Tat protein (16 μ g) in 200 μ l of ISCOM and 300 μ l of PBS. Animals were observed daily for clinical parameters as described in Example 4. Moreover, 10 ml of blood were withdrawn the same day of inoculation as described in Example 4. The protective effect of vaccination was determined after challenge of the monkeys with 10 MID₅₀ of SHIV89.6P, that was injected by the intravenous route at week 65. The post-challenge follow up, still ongoing, was performed as described in Example 4. The results of this experiment are as follows. In two vaccinated monkeys and in the control monkey no alterations of clinical, haematological and behavioristic parameters were observed. Inflammatory signs or neovascularization in the site of injection were not observed. These results indicate that the pCV-Tat DNA was well tolerated by the animals and was non-toxic at the doses and inoculation

routes used in the experiment. Monkey M1, vaccinated with 200 µg of DNA by the i.d. route, developed Tat-specific IgG antibodies since week 32 (Figure 11). The antibody titers (from week 32 to week 58) ranged between 1:100 and 1:800 (Figure 12). At week 37, epitope mapping analysis (performed as described in legend to Figure 4) showed that these antibodies were directed against specific regions of Tat, mapping at aa 1-20, aa 46-60 and aa 65-80, with titers of 1:200, 1:100 and 1:50, respectively (data not shown). In monkey M2, vaccinated with 500 µg of DNA by the i.m. route, anti-Tat antibodies were barely detected (with a 1:50 titer, not shown) for the entire period of the study. The results are shown in Figure 11. The ability of plasma from monkey M1, vaccinated with 200 µg of DNA by the i.d. route, to neutralize Tat activity was tested by assaying the inhibition of the rescue of viral replication in HLM1 cells incubated with exogenous Tat protein, as described in Example 4. This assay showed that the plasma of monkey M1, diluted 1:2, and obtained at week 37, reduced viral replication induced by 30 ng/ml of exogenous Tat. Conversely, the plasma of the same monkey obtained at time 0 (preimmune) did not block extracellular Tat (Table 19).

TABLE 19

Neutralizing activity of plasma on rescue of viral infection induced by extracellular Tat^a

Samples	Inhibition
Tat + M1 preimmune	0
Tat + M1 immune	51

^a The ability of anti-Tat antibodies to neutralize Tat activity was determined in HLM1 cells by adding 30 ng/ml of recombinant Tat protein, previously incubated with an equal volume of plasma obtained at time 0 (preimmune) or at week 37 (immune) from monkey M1, vaccinated with 200 µg of pCV-Tat plasmid DNA by the i.d. route. The assay was performed and the results expressed as described in Table 4.

The results shown in Table 20 demonstrate the presence of a proliferative response to Tat at week 42 in monkey M1 immunized with 200 µg of DNA by the i.d., whereas in monkey M2 this type of cellular response was not detected.

TABLE 20
Proliferative response to Tat^a

Monkey	Stimulus	Weeks after the primary immunization							
		15	22	27	32	37	42	48	58
M1	PHA	32,9	45	89,3	40,5	3,1	13,3	ND	13,1
	TT	0,8	2,7	1,5	1,3	0,6	9	1,2	1,6
	Tat	0,9	1,7	1,2	1,1	1,1	5,9	1	1
M2	PHA	11,7	18,5	21,8	32,2	1,1	6,2	7	18,9
	TT	0,9	1,8	0,8	1,1	1	1,5	1,1	1
	Tat	0,8	1,4	0,9	1,1	1,1	1,3	1,1	1
M3	PHA	5,1	19,9	18,2	6,6	8,1	77,8	ND	2,1
	TT	7,2	6,2	5,5	2,8	5,6	36,8	1	2,1
	Tat	2,1	1,4	2,2	0,7	1,5	2,8	0,8	0,9

^a PBMC were isolated, stimulated with PHA (4 µg/ml), tetanus toxoid (TT) and Tat (1 or 5 µg/ml) and tested as described in Table 5. Monkeys were vaccinated with 200 µg (M1) of pCV-Tat by the i.d. route or with 500 µg (M2) of pCV-Tat by the i.m. route. Monkey (M3) was not vaccinated but was inoculated since week 10 with 6 µg (5 + 1 µg) i.d. of Tat as a control for skin tests. ND: not done.

The anti-Tat cytotoxic activity (CTL) was detected in monkey M1 at week 42 and 48 and in monkey M2 at week 48. Furthermore, a positive CTL response was observed at week 48 in monkey M3 which was inoculated since week 10 with 6 µg of Tat as a control for skin tests (Table 21).

TABLE 21
Analysis of Tat-specific cytotoxic activity (CTL)^a

Monkey	Week	Target : Effector ratio						CTL activity
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Media	
M1	42	27,4	27,8	17,1	9,8	3,9	17,2	+
	48	ND	ND	21,3	0	11,7	11	+
M2	42	1,2	5,9	2,4	1	0	2,1	-
	48	ND	ND	ND	57	25,1	41	+
M3	42	0	0	0	1,2	0	0,6	-
	48	ND	12,4	4,2	0	0	0	+

^a The assay was carried as described in Table 6. Monkeys were vaccinated with 200 µg (M1) of pCV-Tat by the i.d. route or with 500 µg (M2) of pCV-Tat by the i.m. route. Monkey (M3) was not vaccinated but was inoculated since week 10 with 6 µg (5 + 1 µg) i.d. of Tat as a control for skin tests. ND: not done.

The results shown in Table 22 indicate at week 52 the presence of total antiviral activity (TAA) in both monkeys vaccinated with 200 and 500 µg of DNA.

TABLE 22

Analysis of total antiviral activity (TAA)^a

Monkey	Days post infection	
	7	17
	Minimum infectious dose (TCID ₅₀ /cell)	Minimum infectious dose (TCID ₅₀ /cell)
M1	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
M2	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
M3	10 ⁻³	10 ⁻³

- ^aThe assay was performed as described in Table 13. Monkeys were inoculated with 200 µg (M1) of pCV-Tat by the i.d. route or with 500 µg of pCV-Tat by the i.m. route. Monkey (M3) was not inoculated but since week 10 received 6 µg (5 + 1 µg) i.d. of Tat as a control for skin tests. PBMC were collected at week 52 from the primary immunization and were infected with SHIV 89.6P (10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸ TCID₅₀/cell) The results are represented as the minimum infectious dose of SHIV (TCID₅₀/cell) that was still able to infect the cells.

- The results shown in Table 23 indicate the presence of soluble antiviral activity (CAF) mediated by CD8+ T lymphocytes, at week 22 and 27, in both vaccinated monkeys. This activity was lower in the control monkey.

TABLE 23

Analysis of the CD8+ cell mediated soluble antiviral activity (CAF)^a

Monkey	Weeks from primary immunization	% inhibition of viral replication	
		Acute infection	Chronic infection
M1	22	62	27
	27	56	25
M2	22	74	ND
	27	28	ND
M3	22	24	ND
	27	37	22

- ^a Analysis of the presence of soluble antiviral activity produced by CD8+ T lymphocytes (CAF) derived from monkeys inoculated with 200 µg (M1) and 500 µg (M2) of pCV-Tat and from the monkey M3. The antiviral activity was assayed on acute and chronic infection in CEM x 174 cells infected with SHIV 89.6P and in

OM-10-1 cells chronically infected with HIV-1, as described in Table 7. The results are represented as the percentage (%) of inhibition of viral replication in cells treated with supernatants from CD8+ T lymphocytes compared to untreated cells. The results of the acute and chronic infection shown in the table refer to samples
5 treated with 5 μ l of CD8+ culture supernatants. ND, not done.

The results shown in Table 24 demonstrate that monkey M1, inoculated with 200 μ g of DNA by the i.d. route, had a positive skin test to Tat at week 22.

TABLE 24
Skin test to Tat^a

Weeks post immunization	Monkey		
	M1	M2	M3
10	-	-	-
15	-	-	-
22	+	-	-
27	-	-	-
32	-	-	-
37	-	-	-
42	-	-	-
48	-	-	-
52	-	-	-
58	-	-	-

- ^aTat (1 and 5 µg) in 150 µL of PBS-0.1% BSA or the buffer alone (control) were inoculated i.d. in a previously thrichotomized area of the upper back of the vaccinated animals and in the control monkey (control for the specificity of the response) at weeks 10, 15, 22, 27, 32, 37, 42, 48, 52, and 58 from the primary immunization. The monkey M1 was inoculated i.d. with 200 µg of DNA of the plasmid pCV-Tat, whereas the macaque M2 received 500 µg of the same plasmid, i.m.. Monkey M3 (control) was not vaccinated but since week 10 received 6 µg (5 + 1 µg) i.d. of Tat as a control for skin tests. The appearance of an erythematous nodule, 48 to 72 hours later, indicated the presence of delayed-type hypersensitivity (DTH): ++, $\phi \geq 5$ mm; + ϕ 1-4 mm; ±, erythema without hardening; -, $\phi < 1$ mm.
- These results indicate that the plasmid pCVTat (pCVTat-DNA) was well tolerated and safe both intradermally and intramuscularly at the given doses. Moreover, these results demonstrate that the immunization with the pCVTat-DNA induces both a humoral (although lower than that induced by the immunization with the recombinant Tat protein) and cellular anti-Tat immune response with antiviral effects. Concerning the protective efficacy after challenge (performed at week 65 from the initial immunization), the virological data, including measurements of antigenemia and cytoviremia, and determination of number of proviral DNA copies (DNA-PCR) in PBMCs, indicate

that the monkey M2, immunized i.m. with Tat-DNA, resulted protected upon challenge with 10 MID₅₀ of SHIV-89.6P, whereas the macaque M1, immunized i.d. with a smaller dose of Tat-DNA (200 µg) resulted infected, suggesting that, in regard to the immunization with DNA, the i.m. route is more effective than the i.d. inoculation. The control monkey M3 also resulted resistant to the infection. However, as previously described, this monkey, unlike the controls of the other experimental protocols, received repeated skin tests for Tat in order to control the test specificity (Table 24), and anti-Tat antibodies, although at low titers (1:100), were detected since week 32 from the beginning of the immunization (data not shown). Moreover, the proliferative response to Tat in this monkey showed a weak and sporadic reactivity to the antigen (Table 20). Finally, monkey M3 showed the presence of specific anti-Tat CTLs (Table 21). Although preliminary, these data indicate that the repeated i.d. injection of 6 µg of Tat could have resulted in the immunization of the animal and in the protection from challenge. Thus, the monkey M3 will be considered vaccinated i.d. with the Tat protein and studied as such.

TABLE 25

Analysis of the virological parameters

Monkey	Days post-challenge with SHIV89.6P											
	15				30				60			
	p27 ^a (pg/ml)	DNA PCR (copies/ μg) ^b	Cytoviremia ^c	Anti-SIV IgG ^d	p27 (pg/ml)	DNA PCR (copies/ μg) ^b	Cytoviremia ^c	anti-SIV IgG	p27 (pg/ml)	DNA PCR (copies/ μg) ^b	Cytoviremia ^c	anti-SIV IgG
M1	1796	1278	>2818.3	1:10	68.6	1048	353.9	1:50	<20	8	21.3	1:800
M2	<20	<1	Neg	1:10	<20	<1	Neg	1:50	<20	<1	Neg	1:100
M3	<20	<1	Neg	>1:50	<20	<1	Neg	>1:50	<20	<1	Neg	1:100

The monkey M1 had been immunized i.d. with 200 μ g of pCVTat, the monkey M2 with 500 μ g of pCVTat, i.m.. The macaque M3 was injected several times with 6 μ g of Tat protein, intradermally, in order to control the skin test specificity. Therefore, from the time of challenge on, M3 monkey is considered as a vaccinated monkey. The virological parameters were evaluated as described in the legend to Table 17.

The FACS evaluation of the percentage and of the absolute number of the CD4 and CD8 lymphocytes confirmed the virological data, with a clear reduction (of approximately 4 folds) of the CD4 lymphocytes in the infected monkey, already
5 at the first post-challenge analysis (day 30) and confirmed later on (day 60) (Table 26).

TABLE 26

FACS analysis of CD4 and CD8 subsets.

Monkey	Days post-challenge with SHIV89.6P virus											
	0				15				30			
	%				%				%			
	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	(cells/ μ l)	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	(cells/ μ l)	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	(cells/ μ l)
M1	27.5 (940)	40.7 (1390)	0.68	ND	ND	ND	ND	8.1 (250)	56.5 (1780)	0.14	9.5 (360)	69.7 (2650)
M2	22.2 (490)	36.8 (810)	0.6	ND	ND	ND	ND	16.4 (580)	42.4 (1500)	0.39	10.9 (940)	52.7 (4560)
M3	28.7 (1170)	41.1 (1680)	0.7	ND	ND	ND	ND	19.5 (970)	48.7 (2430)	0.4	17.9 (900)	52.2 (2620)

The analysis was performed as indicated in the legend to Table 18. The monkey M1 had been immunized i.d. with 200 μ g of pCVTat plasmid DNA, the monkey M2 with 500 μ g of pCVTat-DNA, i.m.. The macaque M3 was vaccinated with 6 μ g of Tat protein intradermally.

Based on these results a second experiment was designed in which the effects of the immunization with the pCVTat-DNA were evaluated in 3 monkeys (M9-M11) as compared to the control monkey (M12) that received the pCV0-DNA. All animals were inoculated i.m. in 2 sites on the back with a total of 1mg of pCVTat (M9-M11) or of pCV0 (M12). Either 1 or 5 days before the vaccination, 250 µl of saline solution containing 0.5% of bupivacaine and 0.1% of methylparaben were inoculated into the two marked sites in which successively the plasmid would have been injected. The macaques were vaccinated at time 0 and at week 6, 11, 15, 21, 28, and 32. A final booster was performed at week 36 with the recombinant Tat protein (16 µg) resuspended in 200 µl of ISCOM and 300 µl of PBS. The animals were controlled every day for clinical parameters as described in the Example 4. Moreover, 10 ml of blood were drawn 9 days before the primary immunization and at every immunization, as described in the Example 4. In order to evaluate the protective effects of the vaccination, the monkeys were challenged at week 50 from the beginning of the immunization by intravenous (i.v.) injection of 10 MID₅₀ of SHIV-89.6P. The post-challenge follow-up is still ongoing and is performed as described in the Example 4.

The results of this experiment are the following. No modifications in terms of behavior, clinical parameters, and blood chemistry were noted both in the vaccinated and in the control animals. No signs of inflammation or vascular neo-formations were detected at the injection sites. These results confirm that 1 mg of the plasmid pCVTat DNA, injected i.m., was well tolerated and non-toxic. Anti-Tat IgG were detected since week 15 (figure 13), with titers ranging from 1:50 to 1:100 (data not shown). Moreover, a proliferative response to Tat was detected as early as week 2 in one monkey (M11) (table 27).

TABLE 27

Proliferative response to Tat^a

Monkey	Stimulus	Weeks from primary immunization										
		2	6	11	15	21	28	32	36	40	44	50
M9	PHA	8.9	9.2	17.1	58.2	18	47.1	43.4	3.1	72.6	64.6	7
	TT	2.9	1.7	0.9	1	1.8	0.7	1.1	0.8	1	7	2.7
	Tat	0.4	0.5	0.6	1.5	1.6	0.9	1	0.7	1.1	7	1.9
M10	PHA	8.5	18	19.8	ND	10.1	2.2	14.7	15.2	4.4	8.4	ND
	TT	2.4	0.3	0.8	ND	1.1	0.6	1	0.9	0.6	6.4	ND
	Tat	1	0.3	0.7	ND	1.1	0.5	1	0.9	0.7	4.2	ND
M11	PHA	25.7	43.3		12.1	27.8	3.4	21.3	14.1	15.9	25.8	ND
	TT	4.2	1.9	1.3	0.9	1.1	3.6	1.2	0.8	0.3	1.8	ND
	Tat	5.1	0.8	1.6	0.7	1.1	1.1	1.2	0.7	0.7	3	ND
M12	PHA	28.7	30.9	41	50.7	30.8	7.6	43	22.6	34.6	19.9	55.1
	TT	3.2	1.6	0.9	5.2	1.6	1.6	1.3	1.1	1	0.7	3.1
	Tat	3.2	1.4	0.8	1.3	1	1.6	1	0.8	1	1.6	1.3

^a PBMC were isolated, stimulated with PHA (4µg/mL), or tetanus toxoid (TT, 10 µg/mL), or Tat (1 and 5 µg/mL) and assayed as described in table 5. The monkeys were injected i.m. with 1 mg of either pCVTat (M9-M11) or pCV0 (M12, control). ND, not determined.

Anti-Tat CTLs were detected at week 32 post-immunization (Table 28).

10 TABLE 28

Analysis of the anti-Tat cytotoxic activity (CTLs)^a

Monkey	Week	Target : Effector ratio						CTL Activity
		1:50	1:25	1:12,5	1:6,25	1:3,125	Media	
M9	32	0	0	0	0	0	0	-
	50	4,2	0	0	0	0,9	1	-
M10	32	0	0	9,9	2,7	0	2,5	-
	50	3,5	0	2,3	0	0	1,1	-
M11	32	0	10,5	8,9	3,5	0,9	4,7	+
	50	0	0	0	3,8	0,3	0,8	-
M12	32	0	0	0	0	0	0	-
	50	0	0	0	0	0	0	-

^aThe assay was performed as described in Table 6. The macaques were injected i.m. with 1 mg of either pCVTat (M9-M11) or pCV0 (M12, control).

PBMCs obtained from the monkey M11 at week 44 resulted resistant to in vitro infection with serial dilutions of the chimeric SHIV-89.6P virus by an assay described previously that detects the presence of total antiviral activity (TAA). In fact, TAA is evaluated as the capability of PBMCs from monkeys vaccinated with pCVTat-DNA, grown in the presence of autologous serum, to resist to the infection with serial virus dilutions. (Table 29)

TABLE 29

Analysis of the total antiviral activity (TAA)

Monkey	Days post infection	
	7	17
	Minimum infectious dose (TCID ₅₀ /cell)	Minimum infectious dose (TCID ₅₀ /cell)
M9	10 ⁻²	>10 ⁻² **
M10	10 ⁻³	10 ⁻²
M11	>10 ⁻² *	>10 ⁻² *
M12	10 ⁻²	>10 ⁻² **

^aThe assay was performed as described in Table 13. The macaques were injected i.m. with 1 mg of either pCVTat (M9-M11) or pCV0 (M12, control). PBMCs were withdrawn at week 44 from the first immunization and infected in vitro with 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ TCID₅₀ of the SHIV-89.6P. The results are expressed as the minimum infectious dose of the SHIV (TCID₅₀/cell) still able to infect the cells.

*No culture resulted infected at the highest SHIV concentration used in the assay (10⁻² TCID₅₀/cell). **The cultures became negative on day 17 post-infection.

The results shown in table 30 demonstrate the presence of the soluble antiviral activity (CAF) mediated by the CD8+ T lymphocytes in the vaccinated monkeys and in the control monkey (M12) injected with the empty vector (pCV0).

TABLE 30

Analysis of the soluble antiviral activity (CAF) mediated by the CD8⁺ T lymphocytes (CAF) ^a

Monkey	Weeks from the primary immunization	% inhibition of viral replication	
		Acute infection	Chronic infection
M9	0	21	14.6
	36	77	2.6
M10	0	40	13.8
	36	67	25
M11	0	49	19
	36	42	14
M12	0	65	23
	36	62	14

^aAnalysis of the presence of the soluble antiviral activity mediated by the CD8⁺ T lymphocytes (CAF). PBMCs were obtained from the three monkeys (M9-M11) injected with 1 mg of pCVTat and from the control monkey (M12) inoculated with 1 mg of pCV0. The acute infection assay was carried out in CEMx174 cells infected with the SHIV-89.6P, as described in Table 14. The chronic infection assay was carried out in U1 cells chronically infected with the HIV-1, as described in Table 14. The results are expressed as the percentage (%) of inhibition of viral replication in cells cultured in the presence or in the absence (control) of 5 μ L of supernatants from CD8⁺ T cells.

The production of cytokines (γ IFN, IL-4, TNF α) and of the chemokine RANTES was evaluated at week 44 in PBMCs from both the vaccinated and control monkeys (Table 31).

^aThe assay was performed as described in Table 15. The macaques were injected i.m. with 1 mg of either pCVTat (M9-M11) or pCV0 (M12, control). PBMCs were withdrawn at week 44 after the first immunization. Results are shown as pg/ml of cytokines and RANTES detected at 48 and 96 hours (48/96) respectively.

5 (-), the values were below the cut-off value. The cut-off values (pg/ml) were: γ IFN: 31.2; IL-4: 3.12; TNF- α : 15.6; RANTES: 62.5. ND: not done.

The results show the presence of a weak reactivity to the skin tests with Tat in one monkey (M9) at week 11 (Table 32)

TABLE 32

Skin test to Tat ^a

Monkey	Weeks from the primary immunization						
	11	15	21	28	32	36	44
M9	+/-	-	-	-	-	-	-
M10	-	-	-	-	-	-	-
M11	-	-	-	-	-	-	-
M12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^aTat (1 and 5 µg) in 150 µL of PBS-A, 0.1% BSA or the buffer alone (control) were inoculated i.d. in a previously thrichotomized area of the upper back of the vaccinated animals but not in the control monkeys at weeks 11, 15, 21, 28, 32, 36, and 44 from the initial immunization. The macaques were injected i.m. with 1 mg of either pCVTat (M9-M11) or pCV0 (M12, control). The appearance, 48 to 72 hours later, of an erythematous nodule indicated the presence of delayed-type hypersensitivity (DTH): ++, $\phi \geq 5$ mm; + ϕ 1-4 mm; \pm , erythema without hardening; -, $\phi < 1$ mm.

The post-challenge results indicate that all the vaccinated animals were protected from the infection with 10 MID₅₀ of the SHIV-89.6P, as indicated by the virological tests (plasma antigenemia, determination of the proviral DNA copy number, cytoviremia) that were all negative (Table 33). Moreover, the presence of anti-SIV antibodies in the monkey M11 indicated the exposure to the virus or an abortive infection. On the contrary, they were not detected in the remaining monkeys, therefore we decided to carry out the *in vitro* antibody production assay (IVAP) as well as the lymphoproliferative response to SIV antigens. These assays are ongoing and preliminary data indicate the presence of anti-HIV Env antibodies in all the DNA-inoculated monkeys. The macaques will be inoculated with a higher dose of the virus, since even the control animal M12 resulted resistant to infection. This monkey had been vaccinated with the empty vector pCV0. Recent data from the literature have demonstrated the adjuvant role played by certain DNA sequences that are much more frequent in bacteria than in eukariotic cells, and that, similarly to LPS and mannose, represent a strong stimulus for the natural

immunity (Ref. 179). Thus, it is conceivable that the protection observed in the monkey M12 may be due to the induction of a non-specific antiviral immunity by these bacterial sequences, such as the production of IFN α , IFN β , IL-12, and IL-18, known to exert immuno modulant and antiviral functions. This is strongly suggested by the presence in this macaque of TAA (Table 29) and CAF (Table 30) antiviral activities in the absence of anti-Tat specific humoral and cellular immunity. In fact, these assays also measure non-antigen specific antiviral activities. The naive monkey M13, inoculated with a 3.5 fold lower virus dose than that injected in the macaque M12, resulted infected. These results confirm that 10 MID₅₀ challenge dose with which M12 monkey was inoculated were infectious (Table 33). On the basis of this result the inventor plans to utilize the pCV0 vector or parts of it as an adjuvant.

TABLE 33
Analysis of the virological parameters

Monkey	Days post challenge with SHIV89.6P virus											
	15				30				60			
	p27 ^a (pg/ml)	DNA PCR (copies/ µg) ^b	cytoviremia ^c	Anti-SIV IgG ^d	p27 (pg/ml)	DNA PCR (copies/ µg)	cytoviremia	Anti-SIV IgG	p27 (pg/ml)	DNA PCR (copies/ µg)	Cytoviremia	Anti-SIV IgG
M9	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg
M10	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg
M11	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	1:2	<20	<1	Neg	Neg
M12	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg	<20	<1	Neg	Neg
M13	1876	+f	+e	ND	<20	+f	ND	1:1600	<20	43	ND	1:3200

a,b,c,d The assays were performed as described in Table 17. The macaques were injected i.m. with 1 mg of either pCVTat (M9-M11) or pCV0 (M12, control). The monkey M13 was a naive animal infected with 2.85 MID₅₀ of SHIV89.6P. ^e Viral isolation was performed in place of cytoviremia and resulted positive.
^f DNA PCR was not quantitative and resulted positive.

FACS analysis of the CD4 and CD8 (Table 34) subsets confirmed the virological data.

In fact, a significant decline of the percentage and absolute number of the CD4 lymphocytes was observed at 15 and 60 days post-challenge only for the
5 naive monkey M13, resulted infected as indicated by the positiveness of plasma antigenemia, proviral DNA, and virus isolation. (Table 33).

TABLE 34

FACS analysis of CD4 and CD8 lymphocytes.

Monkey	Days post challenge with SHIV89.6P											
	0			15			30			60		
	%			%			%			%		
	(cells/ μ l)			(cells/ μ l)			(cells/ μ l)			(cells/ μ l)		
	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+	CD4+	CD8+	CD4+/CD8+
M9	21.5 (1500)	37.6 (2630)	0.57	ND	ND	ND	26.4 (1340)	51.6 (2610)	0.51	30.6 (2000)	45.5 (2980)	0.67
M10	39.5 (1050)	36.3 (960)	1.1	ND	ND	ND	34.8 (1730)	41.8 (2080)	0.83	31.6 (3760)	52.2 (6200)	0.61
M11	35.8 (1080)	37.7 (1140)	0.95	ND	ND	ND	28.7 (1330)	36.7 (1710)	0.78	24.5 (890)	48.7 (1770)	0.5
M12	30.9 (1860)	46 (2760)	0.67	ND	ND	ND	26.7 (1300)	49.6 (2420)	0.54	23.7 (2620)	52.1 (5760)	0.45
M13	40.5 (2590)	39.7 (2544)	1.01	38.4 (434)	33.6 (380)	1.14	35.1 (1721)	32.2 (1479)	1.16	3.1 (111)	62.3 (2225)	0.05

^aThe assay was performed as described in Table 18. The macaques were injected i.m. with 1 mg of either pCVTat (M9-M11) or pCV0 (M12, control). The monkey M13 was a naive animal infected with 2.85 MID₅₀ of SHIV89.6P.

These results demonstrate that the vaccination with the pCVTat plasmid was well tolerated and non-toxic and confirm those on the safety and tolerability of the DNA vaccination, obtained in the first pilot study. In addition, these data provide evidence that the pCVTat-DNA plasmid induces a specific humoral (although
5 weaker than that induced by the Tat protein) and cellular immune response with antiviral effects, part of which may be due to particular DNA sequences present in the pCV0 vector that could function as adjuvants.

Immunization protocols that will include combinations of the DNA coding for other HIV-1 and cytokines genes described in the Example 3 will be evaluated. In these
10 experiments SHIV containing the tat, rev, and nef genes of HIV will be used (Ref. 146, 85, 142, 65, 94, 129).

The pCV0 and pCVTat plasmids will be inoculated in the animals utilizing other delivery systems that may improve the immunization effectiveness, such as liposomes, nanoparticles, erythrocytes, gene gun delivery, or Tat DNA will be
15 delivered through the utilization of herpes vectors as described in the prophetic Examples 9 and 10.

Example 6. Therapeutic vaccine.

A protocol of vaccination, based both on Tat-protein and Tat DNA, was made to evaluate the safety and toxicity of anti-Tat vaccine in already infected individuals.
20 The experiment was performed on monkeys infected with decreasing doses of SHIV89.6P and with immunodeficiency disease (AIDS). The viral stock used for the infection was obtained from spleen and lymph nodes of a cynomolgus monkey infected 14 days before. Lymphocytes, purified by mechanical separation, were divided into two aliquots (1.5×10^6 cells/ml each). One aliquot was depleted of
25 CD8⁺ T-cells by using immuno-magnetic beads (Dynal, Norway). Both cultures were stimulated with PHA (1 μ g/ml) for three days and seeded at the concentration of 1×10^6 cells/ml in presence of 50U/ml of IL-2. Viral replication was detected by the presence of reverse transcriptase (RT) in the culture medium
30 harvested after three days. Before testing, the supernatant was clarified and ultracentrifuged at 100,000 rpm, for 11 minutes at +4°C (Beckman TL-100 ultracentrifuge) and pellet was lysed. Thirty μ l of the suspension were added to

the reaction mix (TRIS HCl 1M, pH 8; MgCl₂, 0.5 M; KCl, 1M; Poly A 1mg/ml; oligo-dT 12-18 100 µg/ml; DTT 0.02 M; 1,2 ³[H]-Methyl thymidine tri-phosphate 1mCi/ml) and incubated at 37°C for 60 minutes. The reaction was stopped by adding 500 µl of Na Pyrophosphate 0.1 M pH5 and 600 µl of tri-chlor-acetic acid (TCA) 20% and the sample was spotted on a 0.45 µm filter (Millipore) and then read with a β-counter after the addition of 5 ml of scintillation cocktail (Filter Count, Packard).

Culture media containing more than 20,000 cpm were centrifuged and supplemented with 10% human serum AB. The virus was concentrated by ultracentrifugation at 30,000 rpm (90 minutes at 4°C), resuspended in RPMI 1640 containing 10% of human serum (AB group) and then stored in small aliquots in liquid nitrogen. The viral stock was titred *in vitro* on the human cell lines CEMx174 and C8166 (3 x 10³ TCID₅₀/cell), and *in vivo* on cynomolgus monkeys (3.17 x 10^{5.69} MID₅₀/ml).

A first pilot experiment has been performed on 7 monkeys infected i.v. with SHIV89.6P prepared as described above. Each monkey received 1 ml of SHIV diluted in saline buffer supplemented with 2% of human serum (AB, Rh-) according to the following protocol. One monkey (IM1) was inoculated with 1:500 of viral dilution; two monkeys (IM2, IM3) received the dilution 1:5,000; two monkeys (IM4, IM5) were inoculated with 1:50,000; the monkey IM6 received the 1:500,000 dilution; the last monkey (IM7) received 1:5,000,000 dilution. Each monkey was bled at day 7 before infection with SHIV for determination of the basal parameters. Serum and plasma samples were frozen at -20°C or -80°C and then used to re-suspend the protein inoculum. At time 0 all monkeys were inoculated with SHIV89.6P. Monkeys were checked daily. Moreover, at day 0 and after 2 and 4 weeks they were bled and 10 ml of blood were used for hematological determinations (chemical-clinical analysis, electrolytes, white cells and platelets counts, hemoglobin) and virological and immunological analysis (i.e. plasma p27 Ag determination and viral load in plasma and cells). At week 4 post-infection, 6 monkeys (IM1-6) were infected. The monkey IM7, which received the lowest viral dilution (1:5,000,000) was SHIV-negative (Table 35).

TABLE 35

Detection of the presence of SHIV89.6P in monkeys infected with serial viral dilutions

Monkey	SHIV 89.6P dilution	Weeks post infection					
		0		2		4	
		Viral isolation ^a	p27 (pg/ml) ^b	Viral isolation	p27 (pg/ml) ^b	Viral isolation	p27 (pg/ml) ^b
IM1	1:500	ND	ND	+	>450	+	47
IM2	1:5.000	ND	ND	+	>450	+	161.8
IM3	1:5.000	ND	ND	+	>450	+	6.67
IM4	1:50.000	ND	ND	+	<20	+	>450
IM5	1:50.000	ND	ND	+	>450	+	166.7
IM6	1:500.000	ND	ND	-	>450	+	0
IM7	1:5.000.000	ND	ND	-	0	-	0

- 5 ^aVirus isolation and ^b plasma p27 Ag (pg/ml) were carried out as described in the legend to table 17. Monkeys were inoculated i.v. with serial dilutions of the virus stock, as described in text.

After 7 weeks from infection, all the animals showing serious immunodeficiency
 10 symptoms were vaccinated with both the Tat protein and DNA of the plasmid pCVTat according to the following protocol. Monkeys IM1, IM3, IM5 and IM6 received the Tat protein (20µg), dissolved in 250 µl of PBS-A supplemented with 0,1% BSA and 20% of autologous plasma and then added to 250µl of Alum adjuvant. The protein inoculum was performed sub-cutaneously on a single site of
 15 monkey's upper back, whether the plasmid pCVTat (1 mg), resuspended in 1 ml of PBS-A, was injected i.m. in a different site in the back. Monkeys IM2 and IM4 (controls) were injected with 250 µl of Alum and 250 µl of PBS-A, 0.1% BSA 20% autologous plasma, s.c., in a site of the upper back and with pCV-0 (1 mg) resuspended in 1 ml of PBS-A, i.m., in a site in the upper back different from the
 20 previous one. The uninfected monkey IM7 was not vaccinated. The schedule of vaccination consisted of a time 0, corresponding to 7 weeks after SHIV infection, and 1, 4, 5, 10, 11, 13, 14, 17, 18 weeks on. To evaluate the effects of this vaccination on disease progression, each macaque was daily checked for the presence or signs of disease and at time 0 and after 3, 8, 12, 16 and 21 weeks, 10

ml of blood were withdrawn for laboratory tests (chemical-clinical analysis, electrolytes, white cells and platelets counts, hemoglobin), for the evaluation of immunological status (presence of specific immunoglobulins, measure of Th1 and Th2 cytokines, chemokines production), for characterization of lymphocytes by FACS analysis (CD4, CD8, CD28, CD40, CD86, CD20, CD2, CD26 and CD20), and finally for evaluation of virological parameters (proviral DNA detection by semi-quantitative PCR, plasma viral load by competitive RT-PCR, plasma p27 Gag antigen by ELISA and presence of anti-SHIV Ab, as described previously). Other boosts will be made on the basis of the immunological, virological and clinical results.

After the last inoculum, monitoring will be scheduled monthly and at the appearance of clinical modifications. PBMC, sera, plasma and urine samples will be frozen at every time point for future tests as previously described.

The results already available from this experiment, obtained at week 8 after immunization, are described. In both the vaccinated asymptomatic and control monkeys no signs of inflammation and neo-angiogenesis in the inoculation sites or general symptoms of disease were observed. No modifications of the clinical status were evident in the monkeys already symptomatic. Moreover, no activation of viral replication was detected. Taken together these results indicate the absence of toxicity or increased viral replication in the monkeys vaccinated with a biologically active Tat protein or DNA (Table 36).

TABLE 36

Analysis of virological parameters

Monkey	Weeks from the beginning of vaccination					
	0		3		8	
	p27 (pg/ml)	DNA PCR copies/ μ g	p27 (pg/ml)	DNA PCR Copies/ μ g	p27 (pg/ml)	DNA PCR Copies/ μ g
IM1	12.3	68	17.3	52	141	41
IM3	0	61	0	48	0	71
IM5	97.1	20	21.7	15	23.6	95
IM6	0	43	0	55	0	24
IM2	21.2	ND	36.6	53	27.4	78
IM4	81	195	22	288	15.4	135
IM7	ND	ND	ND	ND	0	>1

The tests were performed as described in Table 17. Monkeys IM1, IM3, IM5 and

IM6 were injected with Tat protein (20 μ g) and Alum adjuvant s.c. and with pCVTat (1mg) i.m.. Monkeys IM2 and IM4 (infected controls) were injected with Alum adjuvant s.c. and pCV0 (1mg) i.m.. IM7 was an uninfected naive monkey.

FACS analyses indicate that no modifications were observed in CD4+ and CD8+ T-lymphocytes after vaccination (Table 37).

These data confirm that both Tat protein and pCVTat plasmid, at the used doses and inoculation routes, were well tolerated and without any toxic effect in the vaccinated monkeys and, moreover, they did not increase viral replication nor the CD4 T cell decline in infected animals.

5 **Example 7. Co-stimulation of purified CD4+ lymphocytes from SIV-infected monkeys, with anti-CD3/28 coated beads results in a logarithmic expansion of the cell number without significant viral replication and transmission.**

Peripheral blood mononuclear cells were depleted of CD8+ cell-population by using anti-CD8 immuno-magnetic beads (DynaI, Oslo; Dynabeads M-450 CD8).
10 The purification degree was evaluated by FACS analysis and considered as acceptable if higher than 95%. The CD8-depleted cells (named CD8-PBMC) were grown in the presence of PHA (2µg/ml) and IL-2 (40U/ml) or immuno-magnetic beads previously coated with two monoclonal antibodies against the CD3 (Clone FN18, BioSource) and the CD28 (Clone 9.3) antigens (anti-CD3/28 beads). To
15 improve the binding of anti-CD3/28 beads with target cells, the incubation was performed on a rotating wheel disposal. Then, the bound cells (named CD8-CD3+CD28+) were selected with a magnet and seeded in culture. Three times a week, cell concentrations were adjusted to the starting level and IL-2 was added where indicated; moreover, regarding the cells stimulated with anti-CD3/28 beads,
20 preliminary results suggest that the continuous stimulation regimen coupled with a constant control of the bead:cell ratio, adjusted at every time point, is highly effective in the induction of the proliferative response. Our previous studies have shown that in the absence of exogenous IL-2, the CD8-CD3+CD28+ cell population proliferates better then CD8-PBMC stimulated with anti-CD3/28 beads.
25 Moreover, the addition of exogenous IL-2 (40U/ml, three times per week) significantly increases the kinetic of proliferation both in terms of number of cells and duration of effect (Figure 14).

To evaluate the antiviral activity of this stimulation, CD8-CD3+CD28+ purified cells
from 4 uninfected monkeys were infected at day 0 with 0.1 M.O.I. of SIV and then
30 cultivated under continuous stimulation. CD8-PBMC stimulated with PHA and IL-2 were the control of the experiment. Viral infection was followed through detection

of p27 Gag antigen in culture supernatant by a commercial ELISA (Coulter, Hialeah, FL). The p27 Gag antigen levels (ng/ml) were measured on day 6 and 12 after infection. As shown in figure 15, there is a significant difference in the infection in the two stimulation regimens. In fact, at day 6 after infection, the p27 antigen in the CD3/28 beads-stimulated cultures was 40% to 87% lower than cultures stimulated with PHA plus IL-2, and at day 12 this difference was increased in 2 out of 4 monkeys. This suggests a reduction of viral infection susceptibility. In only one case (MK 9401) we observed a viral propagation in both stimulation regimens.

The results here described demonstrate that *Macaca fascicularis* is a good model for the ex vivo expansion of lymphocyte sub-population by anti-CD3/28 beads co-stimulation, without viral replication. This represents the rationale for the therapeutic vaccine we propose, based on expansion and re-infusion of autologous anti-viral specific lymphocytes, in HIV-infected individuals.

Example 8. Use of dendritic cells for vaccination.

The dendritic cells (DC) and macrophages, in a lesser extent, are able to efficaciously present antigens to the T lymphocytes and induce, in this cell subset, proliferation or acquisition of specific cytotoxic activities. These cells are named "antigen presenting cells"(APCs) and can start the immune response. Thus, DC may be utilized in *ex vivo* immunization protocols. For this reason, DC precursors were isolated from peripheral blood of *Macaca fascicularis* by culturing in vitro adherent cells after seven days of GM-CSF and IL-2 stimulation. Alternatively, CD34+ cells were purified with immuno-magnetic beads and then cultured in vitro with GM-CSF and TNF- α for 14 days. To confirm that DC were isolated, morphologic analysis and phenotypic characterization (FACS analysis and immuno-histochemistry) were performed. Functional analysis was based on the unique capability of DC to induce proliferation of allogeneic lymphocytes.

The results obtained fully confirm the effectiveness of the purification and the functional characterization of DC. In details, to isolate DC precursors, PBMCs, obtained by Ficoll density gradient centrifugation, were again stratified on Percoll discontinuous gradient (50% and 42.5%). The cellular fraction that, after

centrifugation at 500 g for 30 min, was between the two gradients was mainly constituted of monocytes (as confirmed by FACS analysis, data not shown). These cells were kept at 4°C to avoid cell adhesion to the plastic tubes, then collected, washed, counted and seeded in culture at 37°C. The day after, non
5 adherent cells were washed away with 4 gentle washings. To induce differentiation into DC, a complete medium supplemented with GM-CSF (200 ng/ml, Leucomax, Sandoz, Milan, Italy) and IL-4 (200 U/ml, Pepro tech, London, England) was added to adherent cells. As control, a complete medium without cytokines was added to induce the normal differentiation of monocytes in the
10 macrophage lineage. Twice a week, half of the supernatant was replaced with fresh medium identical as that one utilized at day 0. The maturation of DC in the wells treated with cytokines was detected by typical morphological changes, like clustering, loss of adherence and development of cellular offshoots. The monocyte/macrophages adherent cells grown without cytokines were detached by
15 EDTA treatment (0.5 mM in PBS-A), washed twice, counted and resuspended in fresh medium at different concentrations depending on the experiment performed. For the allogeneic mixed leukocyte reactions (AMLR), the obtained APCs (DC or macrophages) were tested with a fixed amount of allogeneic T lymphocytes, purified by Ficoll and Percoll gradients and adhesion, and then frozen. The AMLR
20 was performed in 48-well plates with 0.5×10^6 T lymphocytes and serial dilutions of APCs. At day 4 of culture, a fixed amount of the cell suspension was seeded in a 96-well plate in triplicate. One μCi of ^3H -thymidine was added to each well and the plate was then incubated at 37°C for 16 hours. At the end of incubation, the amount of ^3H -thymidine incorporated by the cells was measured with a β -counter
25 and expressed as counts per minute (cpm). Results indicate that the DC obtained are potent APC as demonstrated by the higher induction of proliferation in allogeneic human lymphocytes compared to the macrophages stimulation, and by the capability to induce T lymphocyte proliferation in monkeys at all the concentrations used (Figure 16B).

30 For the use in vaccination, DC will be resuspended at the concentration of 1×10^5 cells/100 μl in RPMI 1640 supplemented with 5% of autologous serum, 10 mM of

Hepes buffer, 100 U/ml of penicillin-streptomycin, 0.5 mg/ml of amphotericin B and 0.03% of glutamine, and then incubated for 2 hours at 37°C in presence of Tat protein or Tat-peptides or combination of Tat, Rev, Nef, Gag and/or cytokines. Then, this treated DC will be inoculated twice or more within 2-4 weeks from first injection, intravenously. Alternatively, DC will be transduced with *tat*-gene-containing vectors alone or associated with other vectors mentioned above and then injected intravenously.

Prophetic example 9

The described immunogens will be utilized in order to induce and/or potentiate a specific immune response at the mucosa level. One of the approaches is based on the use bacteria (*S. Gordonii* and *Lactobacillus*) "engineered" to express the viral antigens mentioned above. These bacteria colonize the oral and vaginal mucosa of mice and induce a specific both local and systemic antibody response against heterologous antigens expressed on surface of recombinant bacteria (Ref. 116, 104, 106, 121, 117, 139, 105, 107). These bacteria can work as live vectors of vaccines and take the advantage to cause a prolonged stimulation of the immune system. Moreover, we will evaluate the possibility to co-express, on the bacterial surface, viral antigens and molecules involved in the immune response, such as the B sub-unit of the temperature-sensitive toxin of *E. Coli* or cytokines.

The preparation of the recombinant strains of *S. Gordonii* will be carried out as previously described (Ref. 116). Briefly, (i) chromosomal integration of recombinant DNA molecules; (ii) transcriptional fusions with strong chromosomal promoters; (iii) transcriptional fusions with the gene coding for the protein M6, a surface protein of *Streptococcus*. The recombinant strains of *S. Gordonii* will be utilized to colonize the vaginal mucosa of the monkeys. It has been demonstrated that the recombinant strains of *S. Gordonii* which express the V3 region of gp120 of HIV-1 and the E7 protein of HPV-16, permanently colonize the vaginal mucosa of the mouse after a single inoculum, inducing an antigen-specific antibody response both local and systemic. The systemic response is in prevalence composed of IgG2a antibodies, which suggests a Th1-type response (Ref. 105, 106). We will select human vaginal strains of *Lactobacillus*, which are able to

colonize the vaginal mucosa of the monkeys. Thereafter, an already developed genetic system will be utilized, which permits the expression of heterologous antigens on the surface of *Lactobacillus* (Rush, 1997). This strategy is based on:

5 (i) cloning of genetic fusions (*emm6*/heterologous gene) into insertion vectors which carry homologies with the conjugative transposon Tn916; (ii) transformation of the vectors in bacterial strains which work as intermediate host (*Bacillus Subtilis*); (iii) conjugative mobilization of the recombinant transposons from *B.subtilis* to *Lactobacillus*. The recombinant strains of *Lactobacillus* will be utilized to colonize the vaginal mucosa of the monkeys.

10 Vaginal samples will be obtained utilizing special absorbent filters (Ref. 38, 105, 106). Colonization will be evaluated by plating the vaginal samples on selective plates and expression of HIV antigens in vivo will be monitored by immunofluorescence on vaginal swaps (Ref: 105). By using already standardized methods (Ref. 38), the vaginal swaps will be utilized for i) Papanicolau test, in the case of

15 vaginal vaccination; ii) presence of vaccine antigens in the cells; iii) phenotypic characterization of cells by cytofluorometric analysis (CD1, CD2, CD4, CD5, CD8, CD11c, CD14, CD20, CD28, CD40, CD25, HLA-DR); iv) evaluation of cytokine production (IL-2, IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, IL-15, semi-quantitative RT-PCR), determination of the presence of cytokines and β -chemokines in the mucosal

20 fluids, by Elisa assays; v) dosage of total and specific immunoglobulins (IgA and IgG) in the mucosal fluid by Elisa [Di Fabio et al., Vaccine 15: 1 (1997)]. One month after the last inoculum of the immunogen, the monkeys will be infected intravenously or through the mucosal route with the SHIV 89.6P. The follow-up of the monkeys will be carried out as described in the Example 4. Blood samples will

25 be obtained in order to execute the routine laboratory exams, the evaluation of immunological parameters, both humoral and cellular, as described in the Example 4. The inventor believes that this method can be utilized successfully to induce specific immunization in monkeys, using the vaginal route. Alternatively, the mucosal immunity can be induced by administering the protein immunogens,

30 above described, directly through the mucosal route in the presence of adjuvants, such as the thermo sensitive toxin of *E. Coli* and the choleric toxin, or utilizing

other bacterial and non bacterial delivery systems, such as cytofectins and liposomes or through the inoculation by other routes which are able to induce the most efficient and protective immune response (Ref. 83, 81, 62).

Moreover, the inventor believes that recombinant herpes vectors, expressing the
5 above described viral proteins, can be excellent systems to induce an effective mucosal immune response. Recombinant viral vectors from the herpes simplex type 1 virus (HSV-1) will be utilized to express viral proteins for the induction, of a systemic (through cutaneous immunization, i.d.) and mucosal (through the oral, vaginal or nasal route) responses. Non pathogenic, non replicative herpes vectors
10 will be utilized (Ref. 99) for their ability to include large exogenous sequences, without interfering with the efficacy of the infection (Ref. 52, 64). Therefore, vectors able to contain more than one HIV gene (accessory, regulatory and structural) will be constructed. The mucosal immunity could be induced by an oral, vaginal or nasal vaccine. The herpes vectors can be used in these vaccinal
15 approaches, since HSV-1 can be administered directly by the mucosal route (Ref. 176, 75). The recombinant viruses will be constructed utilizing a two-steps method which facilitates the insertion of exogenous sequences into the viral genome. The first step requires the insertion of an expression cassette with a reporter gene (β -galactosidase, LacZ) cloned in the restriction site *PacI*, which is not present in the
20 HSV-1 genome, flanked by the wanted target sequence of HSV-1, using the standard procedure for the homologous recombination, to interrupt the HSV-1 gene. The recombinant virus is selected by formation of plaques with a blue phenotype, using "x-gal staining". The digestion of viral DNA with *PacI* releases the marker gene and generates two large fragments of viral DNA, not able to
25 produce infectious viral particles. The second step consists of a co-transfection of the viral DNA, digested with the same plasmid used to create the deletion, where the reporter gene is substituted by the wanted gene. The recombinant viruses will be identified through the selection of plaques with a white phenotype after "x-gal staining". This recombination will lead to the elimination of *PacI* sites allowing the
30 use of this method to insert many genes in different loci of HSV-1 genome (Ref. 74). By crossing the different vectors containing the single genes, we might be

able to create all the different genetic combinations. The vector containing all the wanted genes will be isolated by screening with different markers, phenotypes and selective growth on competent cells. All the combinations will be created by alternating DNA transfections and viral recombinations.

- 5 Vectors expressing the single genes tat, rev, nef or gag, will be constructed utilizing, as basic vector, that one containing the mutations in the genes 4-/22-/27-/41, that is better for the low toxicity and the strong expression of the exogenous gene, compared to the other HSV-1 not replicative vectors. Constitutive promoters will be used, such as those from HCMV (human cytomegalovirus immediate early
- 10 promoter), or as ICP0 lep (infected cell protein immediate early promoter) and the Moloney Murine Leukemia virus LTR, for inducing the expression of the genes above mentioned. Non replicative HSV-1 vectors expressing HIV-proteins in different combinations will be constructed. The production of these viruses containing more different genes will be obtained by a genetic crossing over of the
- 15 vectors containing the single genes described in the previous point. Double, triple and quadruple vectors will be created. The vectors will be inoculated in the monkeys i.d. or through mucosal (oral, vaginal or nasal) route with particular attention to this last type of administration (Ref. 176, 101, 102). Vaccination schedule consists of multiple inocula at different time points, which must be
- 20 determined in relation to immunogen or the combination of immunogens. During immunization the animals will be monitored for the evaluation of hematochemical and immunological parameters as described in the Example 4. With methods already standardized vaginal samples will be obtained, that will be studied as previously described in this Example.

25 **Prophetic example 10**

Delivery systems

Tat (protein and/or DNA) alone or in combination (as described above) will be inoculated using new delivery systems, such as erythrocytes or nanoparticles.

- The delivery system involving the use of erythrocytes is based on the possibility
- 30 to deliver the antigen bound on autologous erythrocytes. In fact erythrocytes, at the end of their life span (around 120 days in humans), are removed from the

circulation by the macrophages, known to have the function of professional antigen presenting cells. This property can be used for vaccine strategies. Thus, antigens will be bound to the erythrocytes with a particular technique (Ref. 95, 96), that allows the preservation of the immunogenic properties of the antigen (Ref. 5 29,30). Through this procedure, biotinylation of erythrocytes can be performed in the absence of significative modification of their properties and life span (Ref. 95). Phagocytosis of old erythrocytes by macrophage cells will start an immune response. Antibodies opsonization of erythrocytes carrying the antigen will help antigen removal from circulation. The main advantages of this methodology are:

- 10 1) small quantity of antigen needed to induce a humoral and cellular immune response, 2) long lasting immunization due to the lasting presence of antigens carried by the erythrocytes in the periphery, 3) adjuvant functions provided by the system itself.

In fact, it has been shown in animal studies that the administration of antigens 15 bound on the membrane of autologous erythrocytes induces a similar or higher immune response compared to the immune response obtained with the same antigen administered with Freund's adjuvant (Ref. 29). These properties are very useful to develop an anti-HIV vaccine, in particular when it is needed to increase the immunogenicity of the antigen and the antigen availability and when a low 20 number of immunizations is required. In addition, this strategy can be used when no adjuvants are included in the vaccination protocol. In fact, it has been shown in the mouse model that antigens administered through autologous erythrocytes induce similar or higher immune responses compared to those obtained with the same antigen administered with Freund's adjuvant known as the most powerful 25 adjuvant commercially available (Ref. 29), although not approved for human studies because of the important side effects. Thus, the adjuvant effect of erythrocytes carrying Tat protein, alone or in combination with other immunogens previously described, will be analyzed in non human primates. Comparison among these data and those obtained with the administration of Tat protein in the 30 presence of Alum, RIBI or ISCOM will be performed.

The use of nanoparticles can represent an additional delivery strategy. Functional nanoparticles represent an important system for the transport and release of proteins and DNA (Ref. 27, 172). The nanospheres are colloid polymeric particles of different chemical composition, with a large range of diameter from 10 to 1000 nm. It is possible to adsorb different kind of substances on the surface or inside the nanospheres (oligonucleotides, drugs, proteins, peptides, DNA) that are then brought to the cytoplasm or to the nucleus of cells where they are slowly released. In addition, a small amount of the immunogen is needed to be delivered due to the characteristics of nanospheres. Nanoparticles are a good delivery system especially for molecules with low stability in the extracellular environment or when the delivery is directed to a specific target cell.

The inventor believes that nanospheres can be used to deliver the viral antigens above described. It is possible to prepare and characterize three types of nanospheres designed for the delivery and controlled release of DNA (nanospheres type 1 and 2) and proteins (nanospheres type 3).

For the DNA delivery, two types of nanospheres (nanospheres type 1 and 2) are available. The first type of nanospheres (nanospheres type 1) has a triple layers structure with an external layer of poly-oxy-ethylen-glicole (PEG). Recent reports based on stealth systems studies (Ref. 180, 78), show that PEG makes nanospheres invisible to Kupfer cells. In contrast, the more internal layer is made of monomers with tensioactive features containing quaternary ammonium groups that reversibly adsorb the DNA through a mechanism of ionic exchange and an internal core made of methyl-metacrylate as monomer. These nanospheres are obtained by polymerization in microemulsion involving the polymerization of a vinilic or vinilidenic monomer in the presence of a mix of tensioactive reagents. These reagents are thus able to polymerize the monomer. Of these, one has a quaternary ammonium group interacting with oligonucleotides and the other one has a long chain of PEG.

The second type of DNA delivery system is made of functional nano and microspheres (nanospheres type 2) with hydrogel characteristics. These nanospheres should be made in the presence of DNA to trap it inside the delivery

system. Nanospheres core-shell are needed to deliver proteins (nanospheres type 3). They are made by an internal core of poly-methyl-metacrylate and an external shell of hydrosoluble statistic copolymer of acrylic acid and methyl-metacrylate, known to have an high degree of affinity for proteins (Ref. 79, 80). This copolymer is commercially available (EUDRAGIT) and is obtained with different percentages of the two co-monomers. The preparation process leading to the manufacture of this second type of nanospheres involves the polymerization in dispersion. The synthesis involves the radical polymerization of a vinilic or vinilidenic monomer in the presence of EUDRAGIT having steric stabilizing functions. After nanospheres nucleation, the EUDRAGIT arranges outside the particles. Thus, modifying the concentration of the radical initiator, the ratio between the monomer and EUDRAGIT and the reaction time, numerous nanospheres samples are obtained with different morphologic and chemical characteristics.

Thus, it can be evaluated whether the delivery of Tat protein or Tat DNA by nanoparticles, alone or in combination with the immunogens mentioned above (either protein or DNA) will induce an immune response against HIV. In particular, the humoral or cellular-mediated immune responses will be evaluated and compared to those obtained with the not delivered immunogens in the monkey model.

The inventor believes that the information derived from these studies can be useful to develop an anti-HIV vaccine. In addition, the information derived from this experimental protocol will be transferred also to other vaccines studies, in particular to those studies dealing with low immunogenicity recombinant proteins or peptides. The possibility to develop a vaccine with only one administration will lead to enormous advantages in terms of efficacy of the vaccine and decrease of managing costs of vaccine programs.

References

1. Agostini et al., Blood 90:1115 (1997)
2. Albini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4838 (1995)
3. Allan et al., Science 230:813 (1985)
- 5 4. Antibodies - A laboratory manual, Eds. Harlow E., Lane D., Cold Spring Harbor Laboratory (1988)
5. Arya et al., Science 229:69 (1985)
6. Aryoshi et al., AIDS 9:555 (1995)
7. Audibert et al., Immunol. Today 14:281 (1993)
- 10 8. Badolato et al., Blood 90:2804 (1997)
9. Barillari et al., J. Immunol. 149:3727 (1992)
10. Barillari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7941 (1993)
11. Barillari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 149:3727 (1993)
12. Blomberg et al., J. Immunol. Methods 160:27-34 (1993)
- 15 13. Blomberg et al., J. Immunol. Methods 168:267-273 (1994)
14. Blomberg et al., J. Immunol. Methods 193: 199-206 (1996)
15. Bohan et al., Gene Expr. 2:391 (1992)
16. Bourgault et al., J. Virol. 66:75 (1992)
17. Boyer et al., Nature Med. 3:526 (1997)
- 20 18. Bruisten et al., J. Infect. Dis. 166:620 (1992)
19. Buseyne et al., J. Virol. 67:694 (1993)
20. Butera et al., J. Virol. 65:4645 (1991)
21. Butera et al., J. Virol. 68:2726 (1994)
22. Cafaro et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 7:204 (1991)
- 25 23. Carrol et al, Science. 276: 273-276, (1997)
24. Carson et al., J. Clin. Invest. 99:937 (1997)
25. Chang et al., J. Biomed. Sci. 2:189 (1995)
26. Chang et al., AIDS 11: 1421 (1997)
27. Chavany et al., Phar. Res. 9: 441 (1994)
- 30 28. Chen et al., J. Immunol. 149:4060 (1992)
29. Chiarantini et al., Vaccine 15: 276 (1997)

30. Chiarantini et al., Clin. Diag. Lab. Immunol. 5: 235 (1998)
31. Chirmule et al., J. Virol. 69:492 (1995)
32. Choppin et al., J. Immunol. 147:569 (1991)
33. Corallini et al., Cancer Res. 53: 1 (1993)
- 5 34. Corallini et al., Cancer Res. 53: 5569 (1993)
35. Culman et al., J. Immunol. 146:1560 (1991)
36. Couillin et al., J. Exp. Med. 180:1129 (1994)
37. Danko et al., Vaccine 12:1499 (1994)
38. Di Fabio et al., Vaccine 15: 1 (1997)
- 10 39. Ensoli et al., IV International Conference on AIDS, Stockholm, 1:241 (1988)
40. Ensoli et al., Nature 345:84 (1990)
41. Ensoli et al., J. Virol. 67:277 (1993)
42. Ensoli et al., Nature 371:674 (1994)
43. Ensoli et al., AIDS Updates, Eds. V. De Vita, Jr., Hellman S., Rosenberg S.A.,
15 Lippincott J.B., Philadelphia; 7: 1 (1994)
44. Felber et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:1495 (1989)
45. Fine et al., Ann. Plast. Surg. 20:6 (1988)
46. Fiorelli et al., J. Clin. Invest. 95:1723 (1995)
47. Folks et al., Science 238:800 (1987)
- 20 48. Franchini et al., Virology 155:593 (1986)
49. Frankel et al., Cell 55:1189 (1988)
50. Fugier-Vivier et al., J. Exp. Med. 186: 813 (1997)
51. Gait et al., Trends Biochem. Sci. 18:255 (1993)
52. Glorioso et al., Ann. Rev. Microbiol. 49:675 (1995)
- 25 53. Gobert et al., Virology 176:458 (1990)
54. Goletti et al., J. Virol. 69:2540 (1995)
55. Gorman et al., Mol. Cell. Biol. 2:1044 (1982)
56. Grabstein et al., Science 264:965 (1994)
57. Grosjean et al., J. Exp. Med. 186: 801 (1997)
- 30 58. Guy et al., Nature 330:266 (1987)
59. Harrer et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 12:585 (1996)

- 60.Harrich et al., EMBO J. 16:6 (1997)
- 61.Hinkula et al., J. Virol. 71:5528 (1997)
- 62.Honenbang et al., Infect. Immun. 62:15 (1994)
- 63.Huang et al., EMBO J. 13:2886 (1994)
- 5 64.Huard et al. Gene Ther. 2:385 (1995)
- 65.Igarashi et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 10:1021 (1994)
- 66.Jonuleit et al., J. Immunol. 158:2610 (1997)
- 67.Jullien et al., J. Immunol. 158:800 (1997)
- 68.Kanai et al., J. Immunol. 157:3681 (1996)
- 10 69.Karlosson et al., J. Virol. 71:4218 (1997)
- 70.Kashanchi et al., J. Virol. 70:5503 (1996)
- 71.Kestler et al., Science 248:1109 (1991)
- 72.Kim et al., Oncogene 7: 1525 (1992)
- 73.Koup et al., J. Virol. 68:4650 (1994)
- 15 74.Krisky et al., Gene Ther. 4:1120 (1997)
- 75.Kuklin et al., J. Virol. 240:245 (1998)
- 76.Landes, Austin, p. 107 (1997)
- 77.Lanzavecchia, Science 260: 937 (1993)
- 78.Lasic et al., Chemical Reviews 95: 2601 (1995)
- 20 79.Laus et al., Polymer 37: 343 (1996)
- 80.Laus et al., Polymers for Adv. Techn. 7: 548 (1996)
- 81.Lehnen et al., Vaccine Research 1:319 (1992)
- 82.Levine et al., Science. 272: 1939-1943 (1996)
- 83.Lewis et al., Vaccine Press, Ed. Robinson, Farrar, Wiblin; Human Press,
25 Totowa, New Jersey (1996)
- 84.Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:8116 (1997)
- 85.Li et al., J. AIDS 5:639 (1992)
- 86.Li et al., Science 268:229 (1995)
- 87.Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:8116 (1997)
- 30 88.Lippincott J.B., Stockholm, Sweden, May 31-June 3 (1997)
- 89.Littaua et al., J. Virol. 65:40 (1991)

- 90.Lövgren et al., Vaccine 14:753 (1996)
- 91.Lu et al., J. Virol. 70:3978 (1996)
- 92.Lubaki et al., J. Infect. Dis. 175:1360 (1997)
- 93.Lucey et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4:43 (1997)
- 5 94.Luciw et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 92:7490 (1995)
- 95.Magnani et al., Biotech. Appl. Biochem. 16: 188 (1992)
- 96.Magnani et al., Biotech. Appl. Biochem. 20: 335 (1994)
- 97.Malim et al., Nature 338:254 (1989)
- 98.Mann et al., EMBO J. 10:1733 (1991)
- 10 99.Marconi et al., Proc. Natl. Acad. Sci 93:11319 (1996)
- 100.Marcuzzi et al., J. Virol. 66:4228 (1992)
- 101.McLean et al., J. Infect. Dis. 66:341 (1994)
- 102.McLean et al., Vaccine 14:987 (1996)
- 103.Mcfarland et al., J. Inf. Dis. 170:766 (1994)
- 15 104.Medaglini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6868 (1995)
- 105.Medaglini et al., Biotech. Annu. Rev. 3:297 (1997)
- 106.Medaglini et al., Vaccine 15:1330 (1997)
- 107.Medaglini et al., Am. J. Reprod. Immunol. 39:199 (1998)
- 108.Meyerhans et al., Cell 58:901 (1989)
- 20 109.Morein et al., AIDS Res. Hum. Retrov. S10:S109 (1994)
- 110.Molecular cloning – A laboratory manual; Eds. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1992)
- 111.Myers et al., Human Retroviruses and AIDS: A compilation and analysis of
25 nucleic acid and amino acid sequences, Los Alamos Laboratory, Los Alamos, NM p.1 (1993)
- 112.Myers et al., Human Retroviruses and AIDS. Theoretical Biology and Biophysics Group. Los Alamos, NH (1995)
- 113.Neuvel et al., J. Virol. 70:5572 (1996)
- 30 114.Nietfield et al., J. Immunol. 154:2189 (1995)
- 115.Nixon et al., Nature 336:484 (1988)

- 116.Oggioni et al., Vaccine 13:775 (1995)
- 117.Oggioni, et al., Gene 169:85 (1996)
- 118.O'Hagan et al., Novel Delivery Systems for Oral Vaccines, Eds. O'Hagan, D.T. CRC Press Boca Raton, FL, p. 176 (1994)
- 5 119.Parslow, Human Retroviruses, Ed. B.R. Cullen, IRL press, Oxford, England, p. 101 (1993)
- 120.Pilkington et al., Mol. Immunol. 33:439 (1996)
- 121.Pozzi et al., in "Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization", eds. Pozzi G. & Wells, J.M. – Landes, Austin, p. 35 (1997)
- 10 122.Puri et al., Cancer Res., 52:3787 (1992)
- 123.Puri et al., AIDS Res. 11:31 (1995)
- 124.Quesada-Rolander et al., ABS 6-S1, 2nd European Conference on Experimental AIDS Research, Stockholm, Sweeden, May 31-June3 (1997)
- 125.Quinn et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 239:6 (1997)
- 15 126.Ratner et al., Nature 313:277 (1985)
- 127.Re et al., J. Acquir. Immun. Defic. Syndr. 10:408 (1995)
- 128.Reimann et al., J. Virol. 70:3189 (1996)
- 129.Reimann et al., J. Virol. 70:6922 (1996)
- 130.Reiss et al., J. Med Virol. 30:163 (1990)
- 20 131.Reiss et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 5:621 (1989)
- 132.Riley et al, J.Immunol. 158: 5545-5553, (1997)
- 133.Rinaldo et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 11:481 (1995)
- 134.Rinaldo et al., J. Virol., 69:5838 (1995)
- 135.Rodman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7719 (1993)
- 25 136.Rodman et al., J. Exp. Med. 175:1247 (1992)
- 137.Rosenberg et al., Int. Immunol. 9 (5):703 (1997)
- 138.Rosenthal et al., Seminars in Immunology 9:303 (1997)
- 139.Rush, et al., in "Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization", eds. Pozzi G. & Wells, J.M. – Landes, Austin, p. 107 (1997)
- 30 140.Sadaie et al., New Biol. 2:479 (1990)
- 141.Saiki et al., Science 230:1350 (1985)

- 142.Sakuragi et al., J. Gen. Virol. 73:2983 (1992)
- 143.Salter et al., Immunogenetics 21:235 (1985)
- 144.Schnorr et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 5326 (1997)
- 145.Sharma et al., Biochem. Biophys. Res. Co. 208:704 (1995)
- 5 146.Shibata et al., J. Virol.65:314 (1991)
- 147.Sipsas et al., J. Clin. Invest. 99:752 (1997)
- 148.Sodroski et al., Science 227:171, (1985)
- 149.Steinaa et al., Arch. Virol. 139:263 (1994)
- 150.Steinman R.M., Exp. Hematol. 24: 859 (1996)
- 10 151.Tahtinen et al., Virology 187:156 (1992)
- 152.Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, NH, (1995)
- 153.Titti et al., Cell. Pharmacol. AIDS 3:123 (1996)
- 154.Trinchieri, Curr. Opin. Hematol. 4:59 (1997)
- 155.van Baalen et al., J. Gen. Virol., 77:1659 (1996)
- 15 156.van Baalen et al., J. Gen. Virol. 78:1913 (1997)
- 157.Vellutini et al., AIDS Res. Hum. Retrov. 11:21 (1995)
- 158.Venet et al., J. Immunol. 148:2899 (1992)
- 159.Viscidi et al., Science 246:1606 (1989)
- 160.Vogel et al., Nature 335: 601 (1988)
- 20 161.Voss et al., Virology 208:770 (1995)
- 162.Wain-Hobson, Curr. Opin. Genet. Dev. 3:878 (1993)
- 163.Westendorp et al., J. Virol. 68:4177 (1994)
- 164.Westendorp et al., Nature 375:497 (1995)
- 165.Wolf et al., J. Immunol. 146:3074 (1991)
- 25 166.Yang et al., J. Virol. 70:4576 (1996)
- 167.Yang et al., J. Virol. 70:5799 (1996)
- 168.Yasutomi et al., J. Virol. 70:678 (1996)
- 169.Zauli et al., Blood 86:3823 (1995)
- 170.Zauli et al., Blood 80:3036 (1996)
- 30 171.Zauli et al., J.Immunol. 157:2216 (1996)
- 172.Zobel et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7: 483 (1997)

- 173. Gibellini et al., Blood 89:1654 (1997)
- 174. Bauer et al., J. Infect. Dis. 165:419 (1992)
- 175. Klein et al., J. Exp. Med. 181:1365 (1995)
- 176. Bowen et al., Res. Virol. 143:269 (1992)
- 5 177. Zamarchi et al., AIDS Res. Human Retrov. 9:1139 (1993)
- 178. Fiore et al., AIDS 5:1034 (1991)
- 179. Roman et al., Nature Med. 3:849 (1997)
- 180. Allen et al., Biochim. Biophys. Acta 1237:99 (1995)

CLAIMS

1. Biologically active isolated Tat protein, fragments thereof and/or mutants and/or Tat DNA for use as a vaccine, said Tat, at picomolar to nanomolar concentrations being capable of: (i) entering and localizing in the nuclei of
5 activated endothelial cells or dendritic cells; and/or (ii) activating the proliferation, migration and invasion of Kaposi's sarcoma (KS) cells and cytokine-activated endothelial cells protein.
2. Biologically active isolated Tat protein, fragments thereof and/or mutants and/or DNA Tat according to claim 1 further capable of: (iii) activating virus
10 replication when added to infected cells as measured a) by the rescue of Tat-defective proviruses in HLM-1 cells after the addition of exogenous protein; and/or b) by the transactivation of HIV-1 gene expression in cells transfected with a HIV-1 promoter-reporter plasmid.
3. Biologically active isolated Tat protein, fragments thereof and/or mutants
15 and/or Tat DNA according to claim 2 further capable of: (iv) inducing in mice the development of KS-like lesions in the presence of angiogenic factors or inflammatory cytokines.
4. Biologically active isolated Tat protein, fragments thereof and/or mutants and/or Tat DNA according to claims 1-3 at amounts ranging between 10
20 ng/ml or less to 1 µg/ml.
5. Biologically active isolated Tat protein, fragments thereof and/or mutants and/or Tat DNA according to claims 1-4 for use in the prophylactic and/or therapeutic treatment of AIDS, tumors, syndromes and symptoms associated with HIV infection.
- 25 6. Protein or peptide or DNA vaccine, prophylactic and/or therapeutic, against AIDS, tumors, syndromes and symptoms associated with the HIV infection, comprising biologically active Tat and/or its mutants and/or portion of the protein or peptides or a DNA as defined in claims 1-4.
7. Vaccine according to claim 6 in which Tat has the following nucleotide
30 sequence (Seq.1):
5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGTC

AGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCATTG
CCAAGTTTGTTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAA
GCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAGTTT
CTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGGCC
5 GAAGGAATAG 3'

and any other Tat variant of any HIV type and subtype.

8. Vaccine according to claim 6 in which Tat has the following amino acid sequence :

NH₂-EPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKAISY

10 GRKKRRQRRRPPQGSQTHQVLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

and any other Tat variant of any HIV type and subtype.

9. Vaccine according to claim 6 in which mutants are selected among the ones having the following nucleotide sequences or part of them:

Nucleotide sequence of cys22 mutant (Seq.2)

15 5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGT
CAGCCTAAACTGCGGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCATT
GCCAAGTTTGTTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAG
AAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAG
TTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGG
20 CCCGAAGGAATAG 3'

Nucleotide sequence of lys41 (Seq.3)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGT
CAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCAT
TGCCAAGTTTGTTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAA
25 GAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAA
GTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAG
GCCCCGAAGGAATAG 3'

Nucleotide sequence of RGD Δ mutant (Seq.4)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGT
30 CAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCAT
TGCCAAGTTTGTTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAA

GAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAA
GTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCCGACAGGCCCGAAGG
AATAG 3'

Nucleotide sequence of lys41-RGD Δ mutant (Seq.5)

5 5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGT
CAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTGCTTTCAT
TGCCAAGTTTGTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAA
GAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAA
GTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCCGACAGGCCCGAAGG
10 AATAG 3'

10.Vaccine according to claim 6 in which mutants are selected among the ones
having the following amino acid sequence or part of them:

Amino acid sequence of cys22 mutant

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTAGTNCYCKKCCFHCQVCFITKA
15 LGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH
Amino acid sequence of lys41

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTAL
GISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Amino acid sequence of RGD Δ mutant

20 NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKAL
GISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

Amino acid sequence of lys41-RGD Δ mutant

NH2-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTAL
GISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

25 11.Vaccine according to claim 6 in which the Tat portions are selected among the
peptide sequences

Pep. 1. MEPVDPRLEPWKHPGSQPKT

Pep. 2. ACTNCYCKKCCFHCQVCFIT

Pep. 3. QVCFITKALGISYGRK

30 Pep. 4. SYGRKKRRQRRRPPQ

Pep. 5. RPPQGSQTHQVSLSKQ

Pep. 6. HQVSLSKQPTSQSRGD

Pep. 7. PTSQSRGDPTGPKE

12. Vaccine according to claims 6-11 comprising proteins or peptides conjugated with the T-helper universal epitope of Tetanus toxoid or any T-helper peptides.
- 5 13. Vaccine according to claims 6-12 in combination with recombinant proteins or peptides of HIV Nef, Rev or Gag or part of them.
14. Vaccine according to claim 6 comprising fusion proteins Tat (wild type or its mutants)/Nef, Tat (wild type or its mutants)/Rev, Tat (wild type or its mutants)/Gag or part of them.
- 10 15. Vaccine according to claim 6-14 in combination with recombinant immuno-modulant cytokines or other molecules, or part of them, augmenting antiviral immune response.
16. Vaccine according to claim 15 in which cytokines are IL-12 and/or IL-15 or IFN α or IFN β .
- 15 17. Vaccine according to claim 6 comprising fusion proteins Tat(wild type or its mutants)/immuno-modulant cytokines, Tat (wild type or its mutants)/IL-12, Tat (wild type or its mutants)/IL-15, Tat (wild type or its mutants)/other molecules, or part of them, augmenting the antiviral immune response.
18. DNA vaccine according to claims 6, 7, 9 comprising DNA encoding for Tat wild-type or its mutants or part of them, inserted in expression vectors.
- 20 19. DNA vaccine according to claims 6, 7, 9 in combination with an expression vector including HIV rev, nef and gag genes, or part of them.
20. DNA vaccine according to claims 18 or 19 in which the vector is a plasmid co-expressing tat (wild-type or its mutants)/rev, tat (wild-type or its mutants)/nef, tat (wild-type or its mutants)/gag or part of them.
- 25 21. DNA vaccine according to claims 6, 7, 9 in combination with DNA molecules inserted in expression vectors encoding for immuno-modulant cytokines or other immuno-modulant molecules, or part of them, augmenting the antiviral immune response.
- 30 22. DNA vaccine according to claim 21 in which the cytokine is IL-12 and/or IL-15.
23. DNA vaccine according to claims 21 or 22 in which the vector is a plasmid co-

expressing tat (wild-type or its mutants)/IL-12, tat (wild-type or its mutants)/IL-15, tat (wild-type or its mutants)/other molecules, or part of them, able to augment the antiviral immune response.

24.Vaccine according to claims 18-23 in which the vector is pCV0.

5 25.Vaccine according to the previous claims including autologous dendritic cells treated and/or untreated according to the previous claims.

26.Vaccine according to the previous claims including adjuvants able to augment the antiviral immune response.

10 27.Vaccine according to claim 26 in which the adjuvant is selected among Alum, ISCOM, RIBI and related mixtures.

28.Vaccine according to previous claims comprising systems for delivery.

29.Vaccine according to claim 28 in which the systems for delivery are selected among nanoparticles, herpes vectors, red cells, bacteria and combinations thereof.

15 30.Vaccine according to claim 29 in which bacteria are selected among *Streptococcus gordonii* and *Lactobacillus*.

31.Vaccine according to claims 29 and 30 in which bacteria are modified to express viral antigens.

20 32.Vaccine according to the previous claims for the immunization of peripheral blood cells from infected individuals, expanded by co-stimulation with magnetic beads coated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies.

33.Therapeutic vaccine according to the previous claims, combined with inhibitors of viral replication.

25 34.Vaccine according to claims 6-33 in which the active principle is delivered to the mucosa.

35. Vaccine according to claim 34, in which the active principle is administered nasally, orally, vaginally and/or rectally.

36.Vaccine according to claims 6-33 in which the active principle is administered through systemic or local route.

30 37.Vaccine according to claim 36 in which the active principle is administered through intramuscular, subcutaneous or intradermal route.

38. Vaccine according to claim 37 in which the active principle is administered intradermally at 1-6 μ g amounts, without adjuvants.
39. Vaccine according to claims 34-38 in which the active principle is carried in a biologically acceptable fluid.
- 5 40. Vaccine according to claims 34-39 further comprising pharmaceutically acceptable carriers and excipients to maximize the principle activity.
41. Vaccine according to claims 34-40 comprising as active principle Tat according to claim 1 at preventive and/or therapeutic amounts.
42. Biologically active Tat nucleotide sequence (Seq. 1):
- 10 5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGT
CAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCAT
TGCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAA
GAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAA
GTTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAG
15 GCCCGAAGGAATAG 3'
43. Biologically active Tat amino acid sequence
NH₂-EPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKAISY
GRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH
44. Biologically active Tat mutant protein having nucleotide sequence selected
20 among:
Nucleotide sequence of the cys22 mutant (Seq.2)
5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGT
CAGCCTAAACTGCGGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCATT
GCCAAGTTTGTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAG
25 AAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAAG
TTTCTCTATCAAAGCAGCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAGG
CCCGAAGGAATAG 3'
Nucleotide sequence of the lys41 mutant (Seq.3)
5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGT
30 CAGCCTAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCAT
TGCCAAGTTTGTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAA

GAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAA
GTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCGAGGGGACCCGACAG
GCCCCAAGGAATAG 3'

Nucleotide sequence of the RGD Δ mutant (Seq.4)

5 5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGT
CAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCAT
TGCCAAGTTTGTTTCATAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAA
GAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAA
GTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCCGACAGGCCCGAAGG
10 AATAG 3'

Nucleotide sequence of the lys41-RGD Δ mutant (Seq.5)

5'ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAGT
CAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAGTGTTGCTTTCAT
TGCCAAGTTTGTTTCATAACAAACGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAA
15 GAAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTCCTCAAGGCAGTCAGACTCATCAA
GTTTCTCTATCAAAGCAGCCCACCTCCCAATCCCCGACAGGCCCGAAGG
AATAG 3'

45. Biologically active Tat mutants amino acid sequence selected among:

Amino acid sequence of cys22 mutant

20 NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTAGTNCYCKKCCFHCQVCFITKA
LGISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

Amino acid sequence of lys41 mutant

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTAL
GISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSRGDPTGPKE-COOH

25 Amino acid sequence of RGD Δ mutant

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKAL
GISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

Amino acid sequence of lys41-RGD Δ mutant

NH₂-MEPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITTAL
30 GISYGRKKRRQRRRPPQGSQTHQVSLSKQPTSQSPTGPKE-COOH

46. Biologically active Tat mutants with peptide sequence selected among :
- Pep. 1. MEPVDPRLEPWKHPGSQPKT
 - Pep. 2. ACTNCYCKKCCFHCQVCFIT
 - Pep. 3. QVCFITKALGISYGRK
 - 5 Pep. 4. SYGRKKRRQRRRPPQ
 - Pep. 5. RPPQGSQTHQVSLSKQ
 - Pep. 6. HQVSLSKQPTSQSRGD
 - Pep. 7. PTSQSRGDPTGPKE
47. Expression vector comprising a DNA sequence selected among the ones listed
- 10 in claims 42 and 44 or parts thereof.
48. Expression vector pCV0 including a DNA sequence selected among the ones listed in claims 42-44 or parts thereof.
49. Expression vector pCV0 according to claim 48, comprising a DNA sequence codifying for a gene selected among tat, rev, nef, gag, IL-12, IL-15 and
- 15 combinations thereof.
50. Transformed cells including the vector according to claims 47-49.
51. Dendritic cells treated with Tat protein or its peptides or mutants according to claims 42-46 or combinations with Rev, Nef, and Gag proteins and/or cytokines.
52. Dendritic cells according to claim 51 transduced with an expression vector
- 20 comprising tat gene.
53. Process for producing biologically active Tat protein or its mutants or its recombinant forms or parts of them comprising to cultivate the cells according to claim 50 and to isolate and purify the thus obtained protein or parts of it.
54. Process for preparing the pCV0 vector according to claim 49, in which the
- 25 corresponding cDNA is amplified by PCR technique using primers selected among:
- Seq. P1. Primer forward Rev: 5'ATGGCAGGAAGAAGC3'
 - Seq. P2. Primer reverse Rev: 5'CTATTCTTTAGTTCC3'
 - Seq. P3. Primer forward Nef: 5'ATGGGTGGCAAGTGG3'
 - 30 Seq. P4. Primer reverse Nef: 5'TCAGCAGTCCTTGTA3'
 - Seq. P5. Primer forward Gag: 5'ATGGGTGCGAGAGCG3'

Seq. P6. Primer reverse Gag: 5'TTATTGTGACGAGGG3'

Seq. P7. Primer forward IL-12: 5'ATGTGGCCCCCTGGG3'

Seq. P8. Primer reverse IL-12: 5'TTAGGAAGCATTGAG3'

Seq. P9. Primer forward IL-15: 5'ATGAGAATTCGAAA3'

5 Seq. P10. Primer reverse IL-15: 5'TCAAGAAGTGTTGAT3'

Seq. P11. Primer forward Tat: 5'ATGGAGCCAGTAGAT3'

Seq. P12. Primer reverse Tat: 5'CTATTCCTTCGGGCC3'

Seq. P13. Primer forward Tat/Rev: 5'GGCCCGAAGGAAATGGCA
GGAAGAAGC3'

10 Seq. P14. Primer forward Tat/Nef: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGT
GGCAAGTGG3'

Seq. P15. Primer forward Tat/Gag: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGT
GCGAGAGCG3'

Seq. P16. Primer forward Tat/IL-12: 5' GGCCCGAAGGAAATGTGGC
15 CCCCTGGG3'

Seq. P17. Primer forward Tat/IL-15: 5' GGCCCGAAGGAAATGAGAAT
TTCGAAA3'

55. Primer selected among:

Seq. P1. Primer forward Rev: 5'ATGGCAGGAAGAAGC3'

20 Seq. P2. Primer reverse Rev: 5'CTATTCTTTAGTTCC3'

Seq. P3. Primer forward Nef: 5'ATGGGTGGCAAGTGG3'

Seq. P4. Primer reverse Nef: 5'TCAGCAGTCCTTGTA3'

Seq. P5. Primer forward Gag: 5'ATGGGTGCGAGAGCG3'

Seq. P6. Primer reverse Gag: 5'TTATTGTGACGAGGG3'

25 Seq. P7. Primer forward IL-12: 5'ATGTGGCCCCCTGGG3'

Seq. P8. Primer reverse IL-12: 5'TTAGGAAGCATTGAG3'

Seq. P9. Primer forward IL-15: 5'ATGAGAATTCGAAA3'

Seq. P10. Primer reverse IL-15: 5'TCAAGAAGTGTTGAT3'

Seq. P11. Primer forward Tat: 5'ATGGAGCCAGTAGAT3'

30 Seq. P12. Primer reverse Tat: 5'CTATTCCTTCGGGCC3'

Seq. P13. Primer forward Tat/Rev: 5'GGCCCGAAGGAAATGGCA

GGAAGAAGC3'

Seq. P14. Primer forward Tat/Nef: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGT

GGCAAGTGG3'

Seq. P15. Primer forward Tat/Gag: 5' GGCCCGAAGGAAATGGGT

5 GCGAGAGCG3'

Seq. P16. Primer forward Tat/IL-12: 5' GGCCCGAAGGAAATGTGGC

CCCCTGGG3'

Seq. P17. Primer forward Tat/IL-15: 5' GGCCCGAAGGAAATGAGAAT

TTCGAAA3'.

10 56.Process for preparing a vaccine according to claims 6-41, wherein Tat is in its non oxidated form.

57.Process for preparing a vaccine according to claims 6-41, wherein Tat, in its lyophilized form, is re-suspended in a biologically acceptable fluid for administration.

15 58.Use of Tat protein wild-type in its active form and/or its mutants and/or parts related to the protein or peptides or the DNA encoding for these proteins or parts of them or peptides to make a protein or peptide or DNA vaccine, preventive and/or therapeutic, against AIDS, tumors, the syndromes and symptoms associated to HIV infection.

20 59.Use of Alum, ISCOM, RIBI and other adjuvants, alone or in combination, to make a vaccine according to claim 6.

60.Use of paramagnetic beads coated with monoclonal antibodies anti-CD3 and anti-CD28 to make a vaccine according to claim 6.

25 61.Therapeutic method for treating AIDS, tumors, syndromes and symptoms associated with HIV infection characterized in that preventive or therapeutic amounts of biologically active Tat according to claims 1-5 are administered.

HIV-1 Tat, or derivatives thereof, alone or in combination, for prophylactic and therapeutic vaccination against AIDS, tumors and related syndromes

Abstract

The present invention refers to Tat as the active principle for a prophylactic and/or
5 therapeutic vaccine against HIV infection, the progression towards AIDS and the
development of tumors and other syndromes and symptoms in subjects infected by
HIV. Tat is in biologically active form either as recombinant protein or peptide or as
DNA. More particularly, the invention refers to a vaccine based on HIV-1 Tat as
immunogen, inoculated as DNA and/or recombinant protein or as peptides, alone or
10 in combination with other genes or viral gene products (Nef, Rev, Gag) or parts
thereof, or in combination with various immuno modulant cytokines (IL-12, IL-15) or
with the gene coding for an immuno modulant cytokine or part thereof. Tat, Nef, Rev,
Gag and the immuno modulant cytokines are administrated both as a mixture of
recombinant proteins, peptides or fusion proteins (Tat/Nef, Tat/Rev, Tat/Gag, Tat/IL-
15 12, Tat/IL-15) or as plasmid DNA.

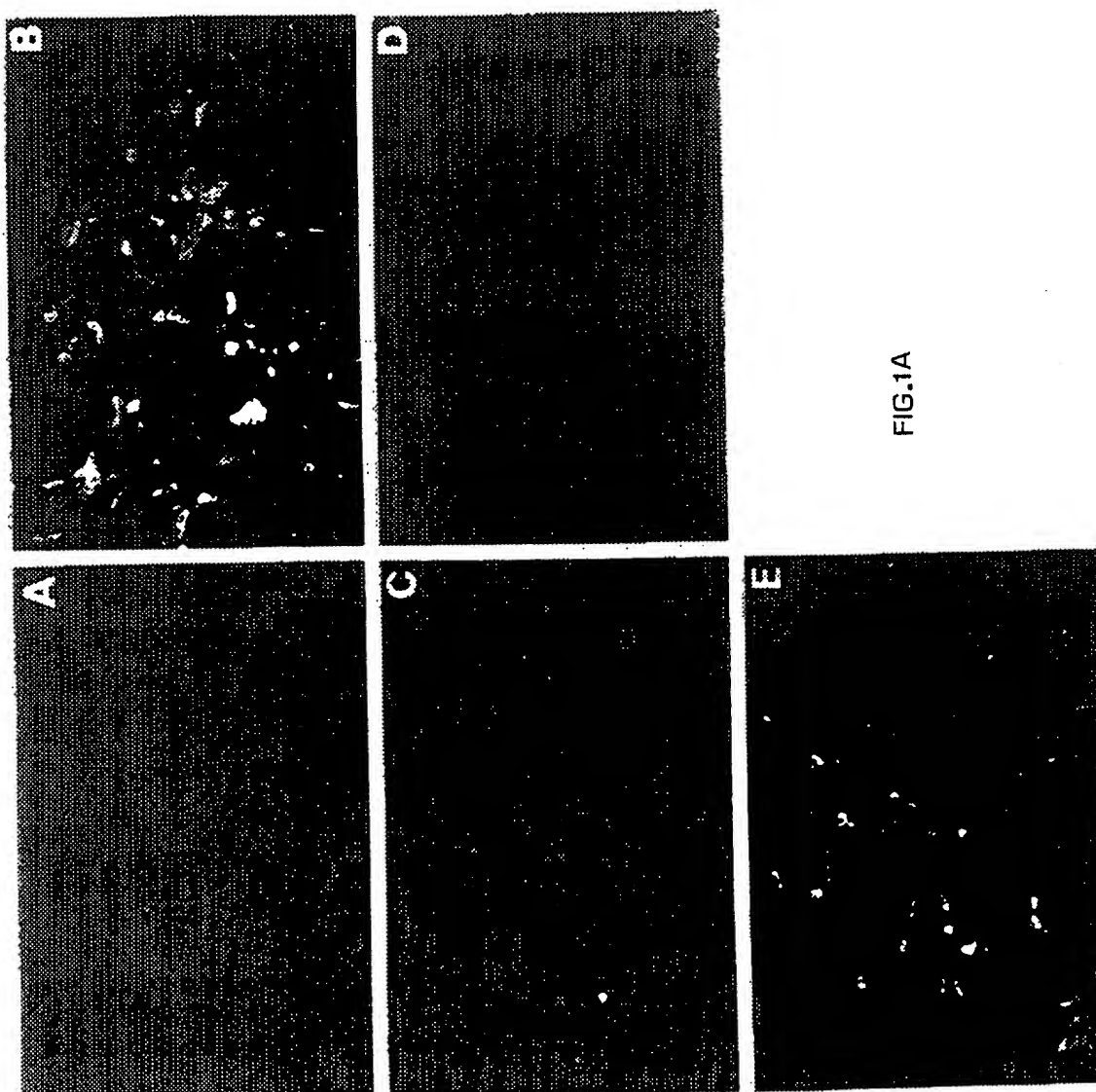


FIG.1A

2/17

% Acetil	0.3	76
----------	-----	----



TAT	+	+
TAT22	+	

FIG. 1B

3/17

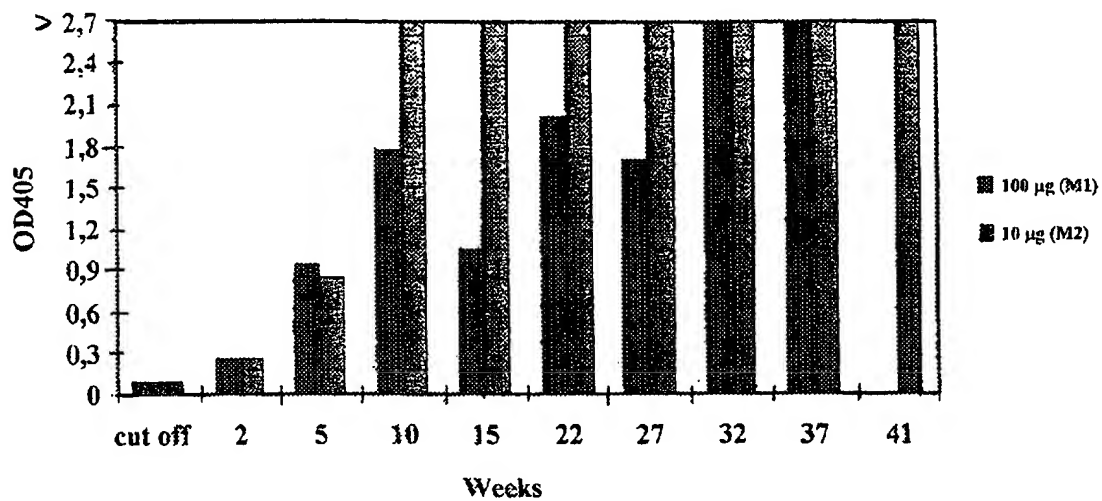


FIG. 2 A

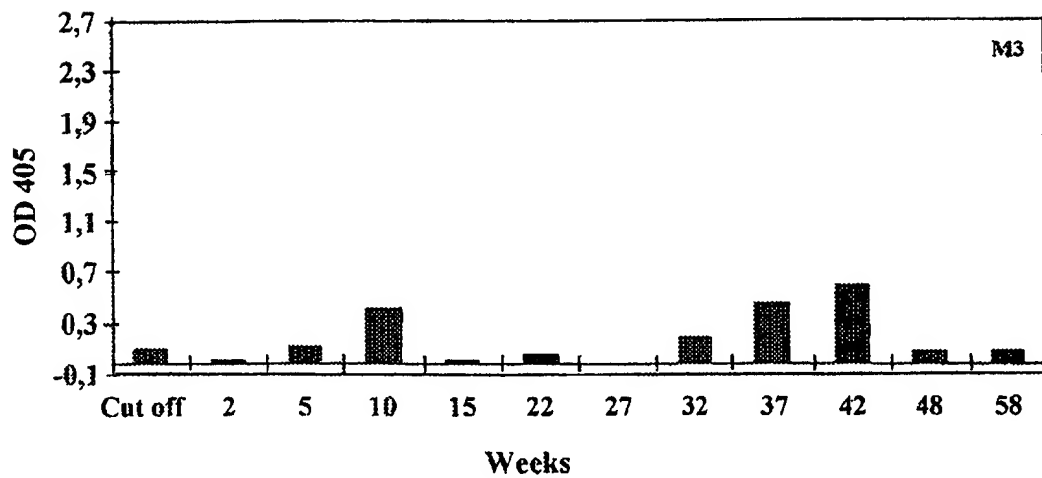


FIG. 2B

4/17

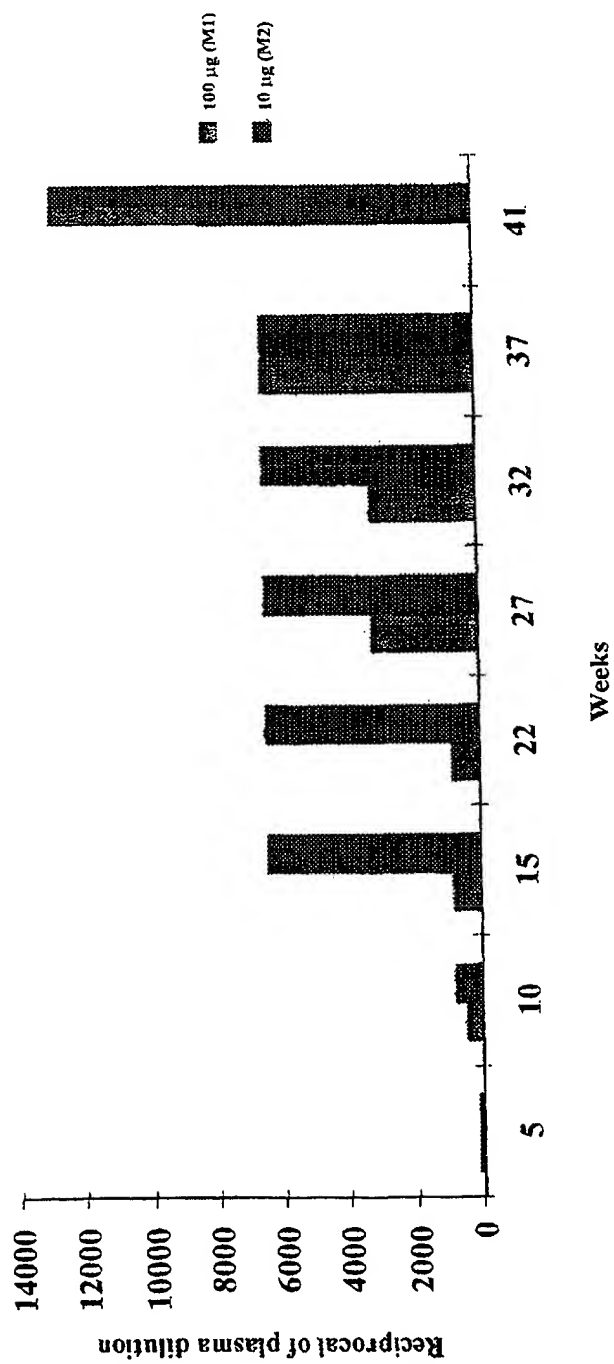


FIG. 3

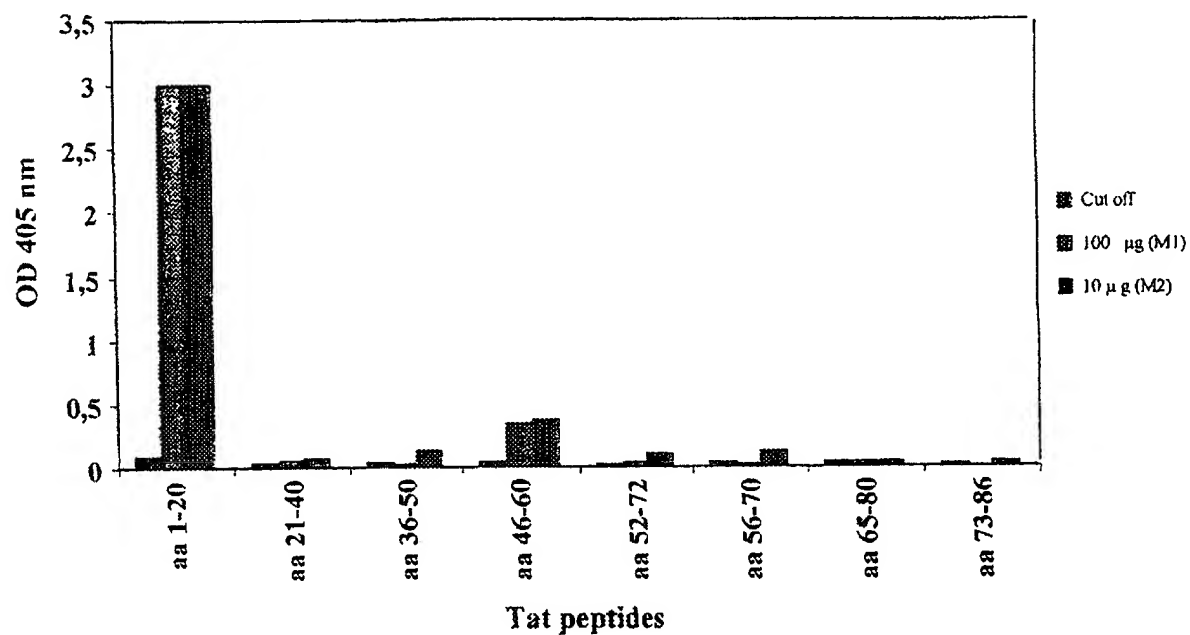


FIG. 4A

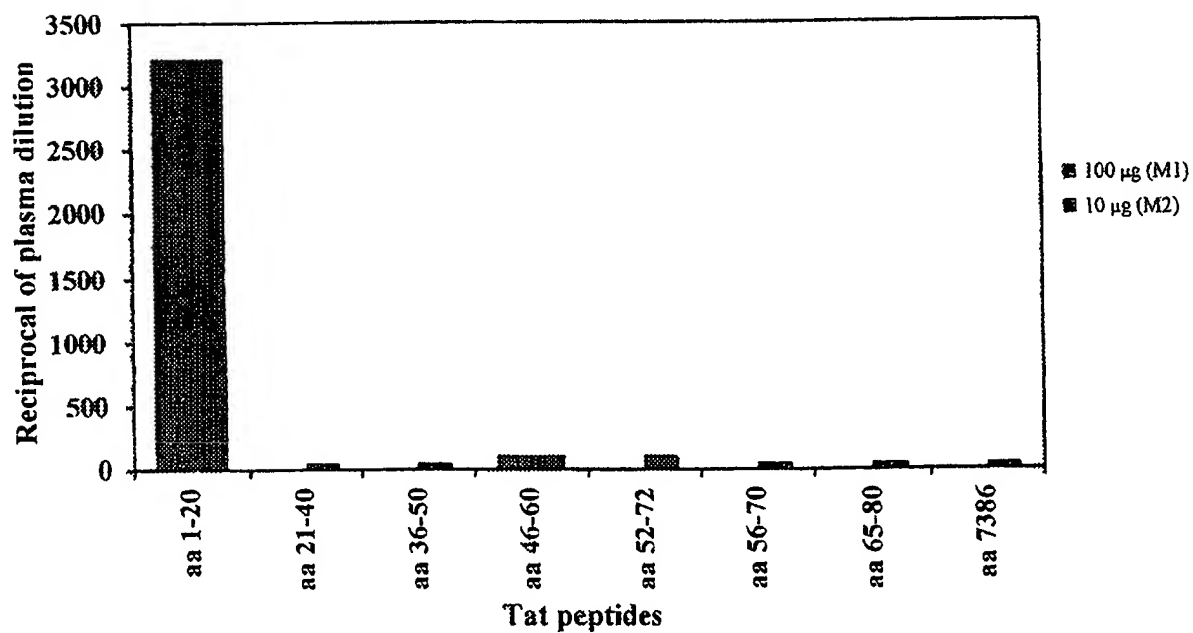


FIG. 4B

6/17

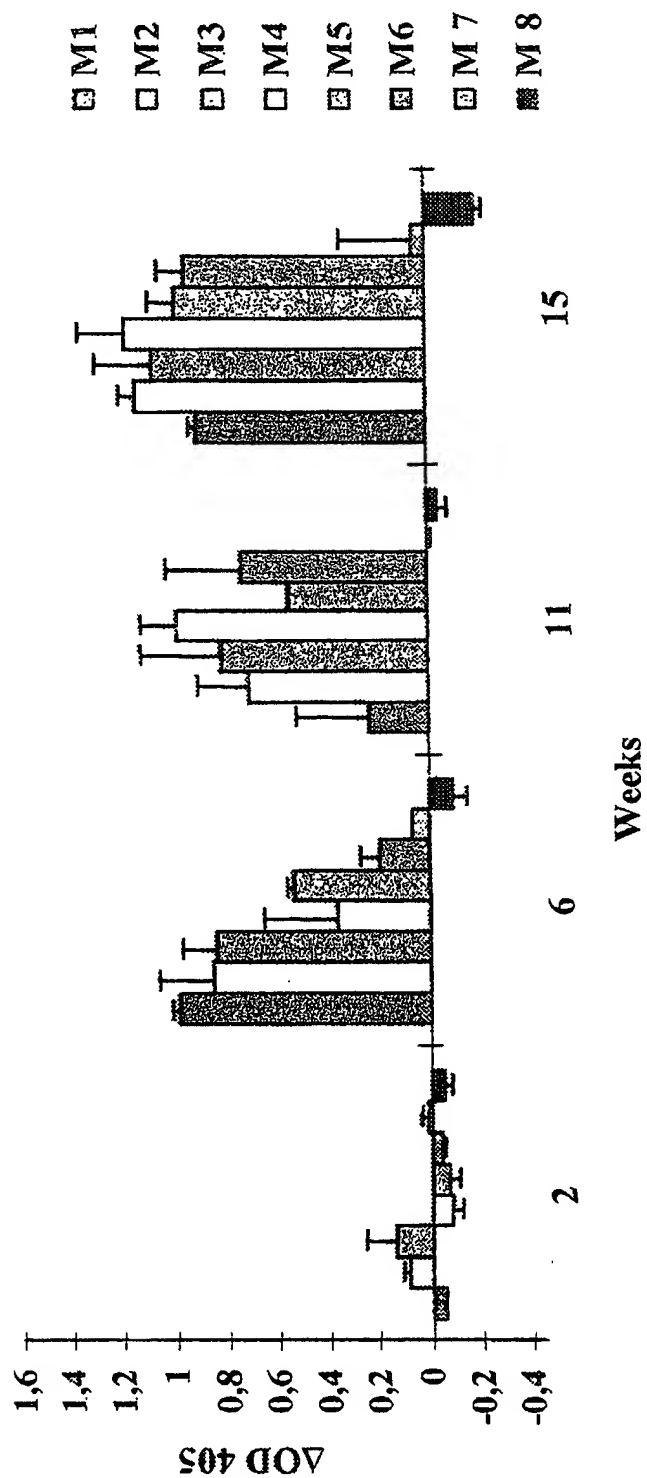


FIG. 5

7/17

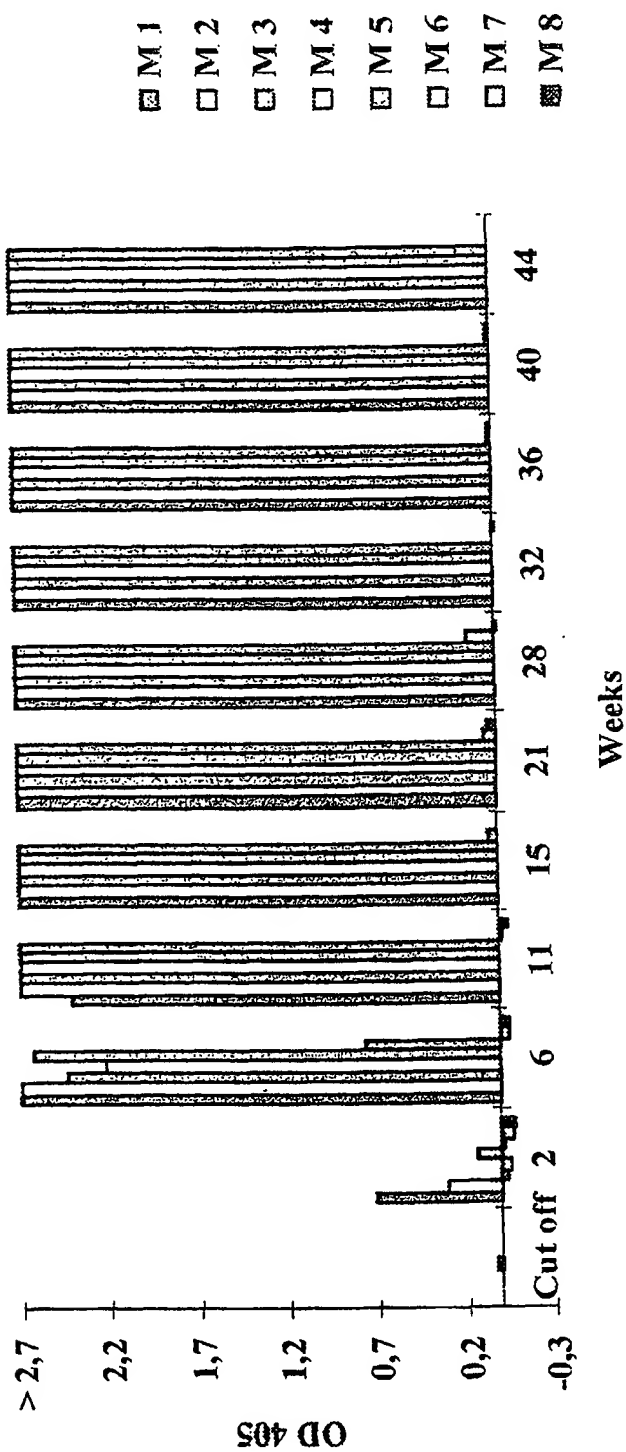


FIG. 6

8/17

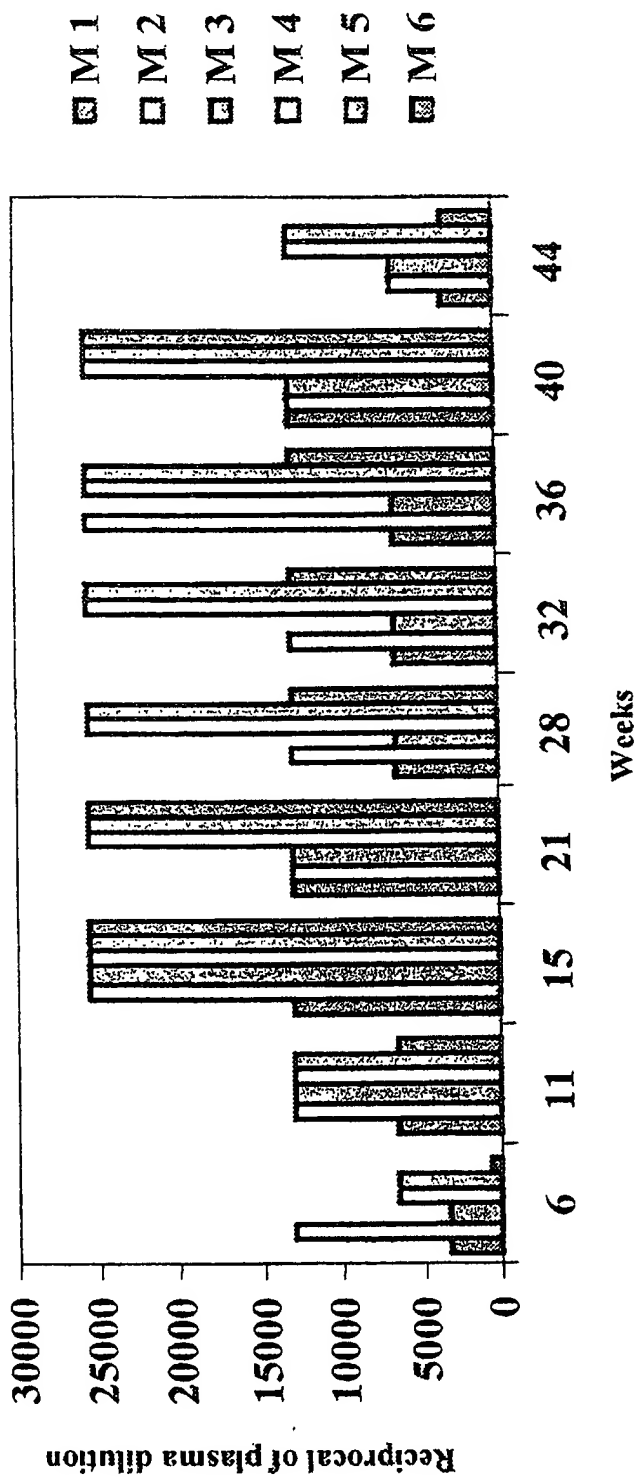


FIG. 7

9/17

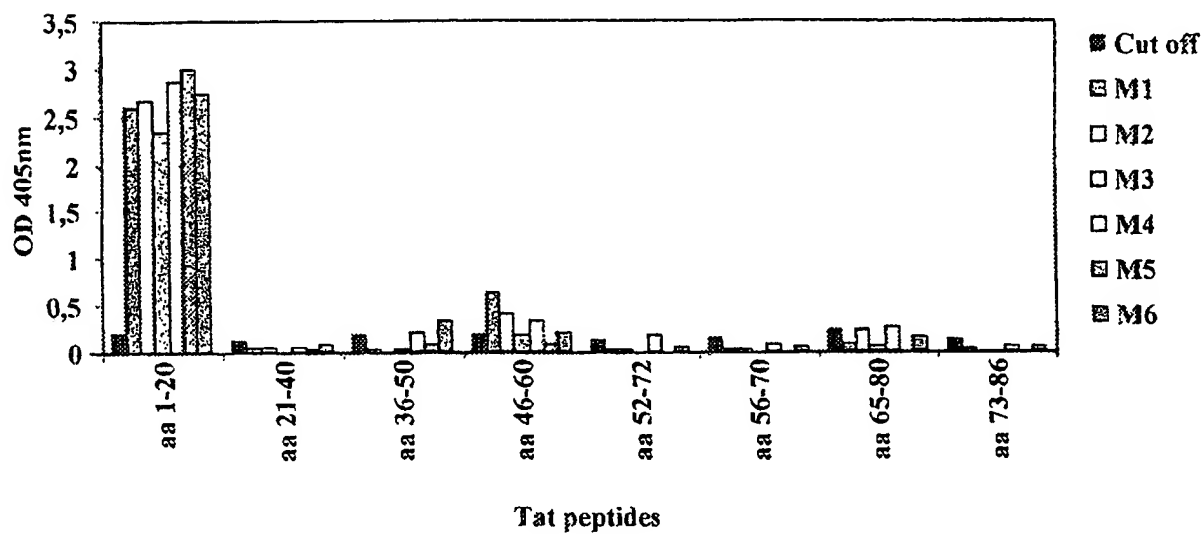


FIG.8A

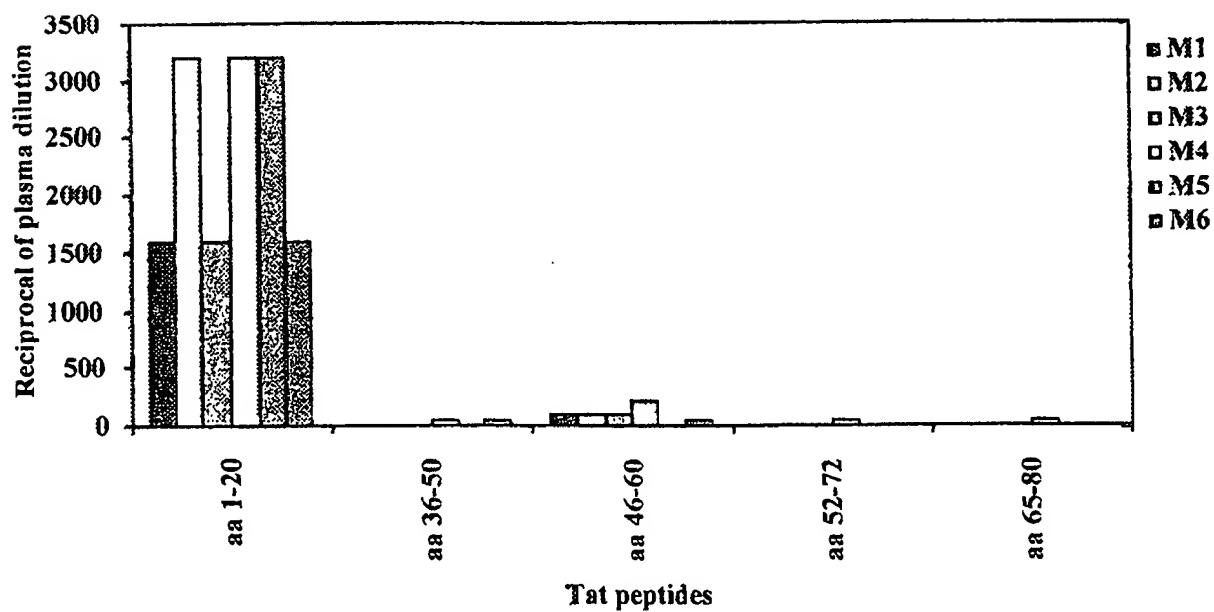
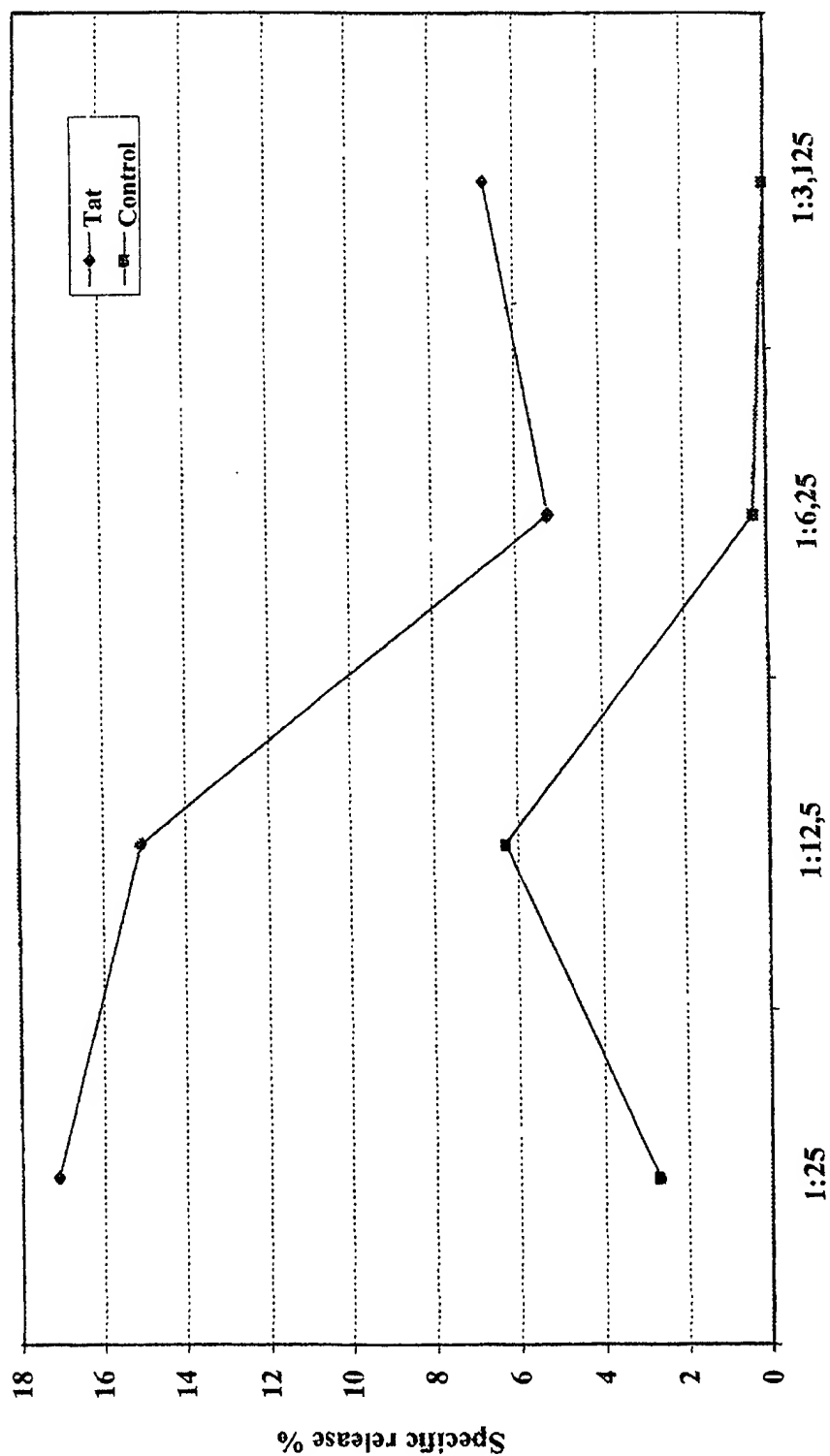


FIG.8B

10/17



Target: Effector ratios

FIG. 9

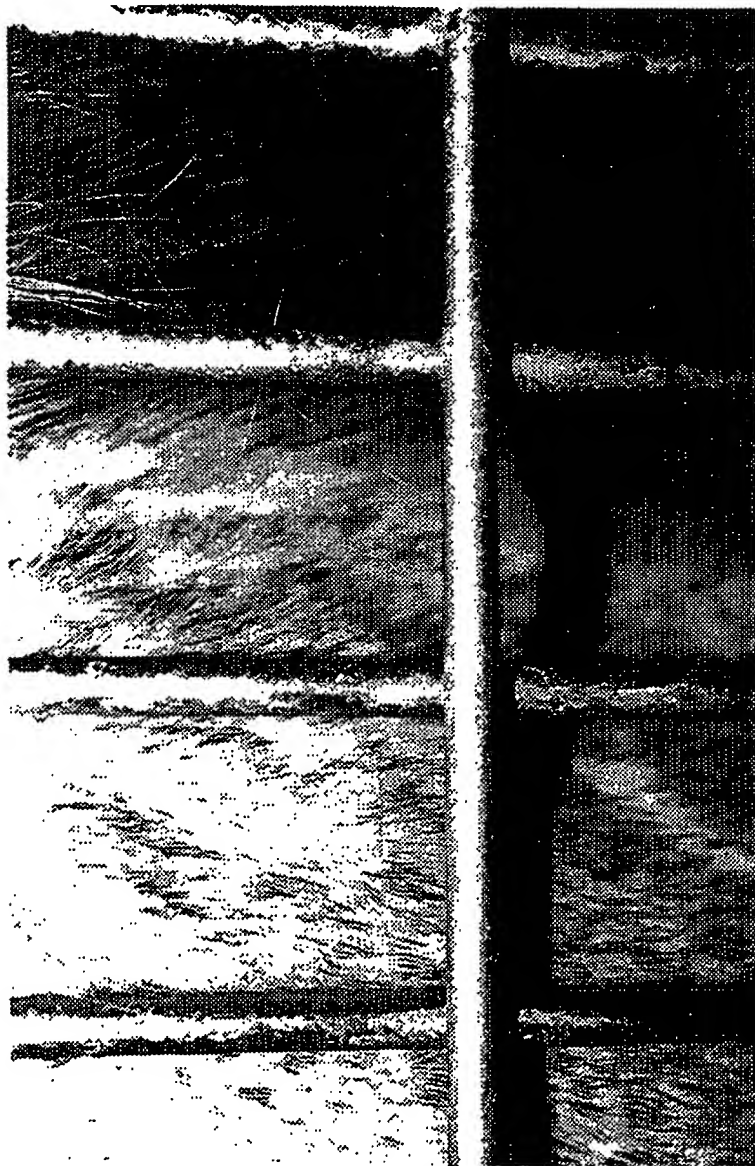


FIG. 10

12/17

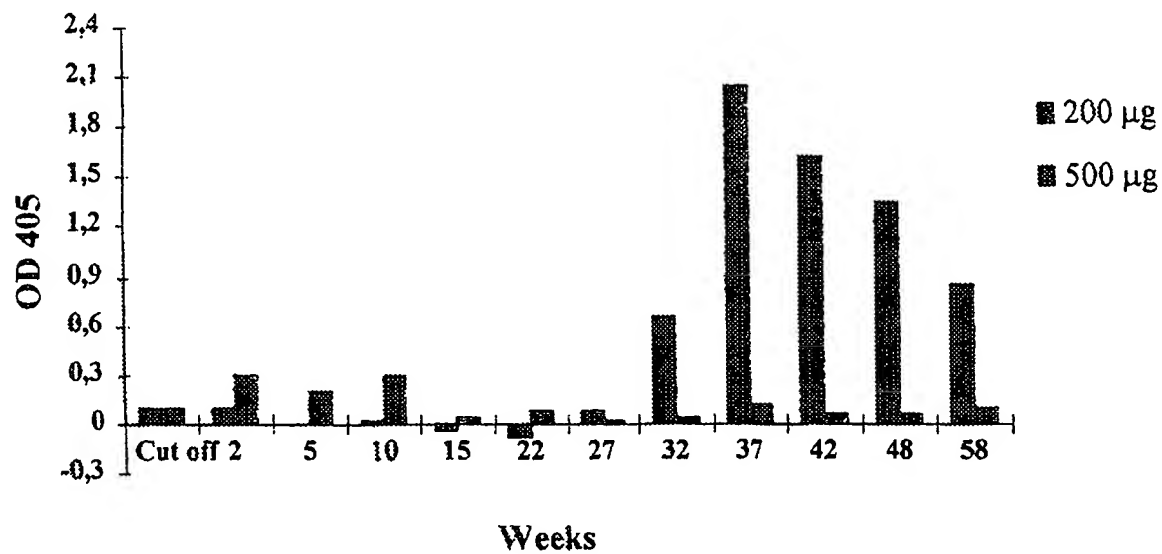


FIG. 11A

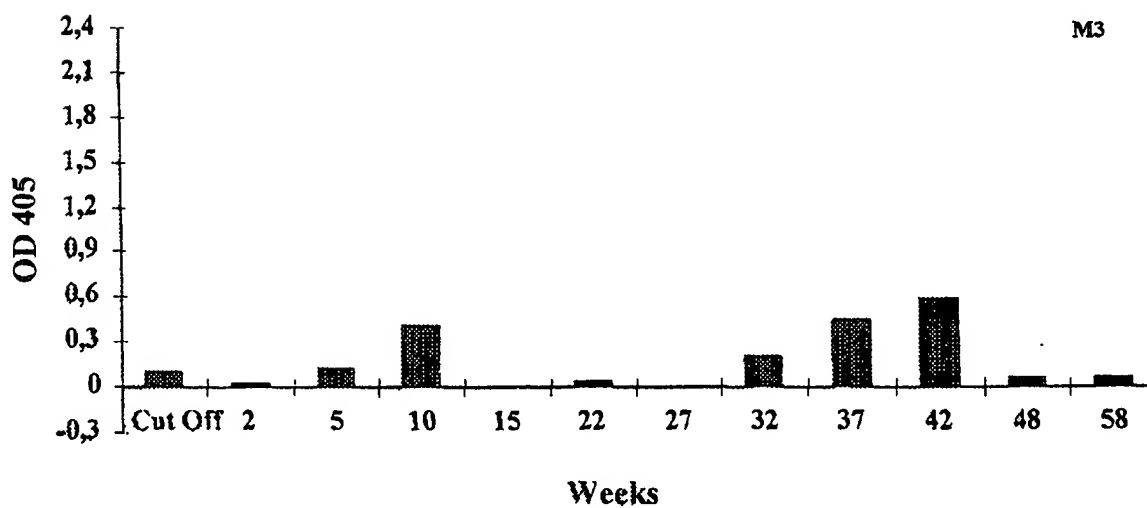


FIG.11B

13/17

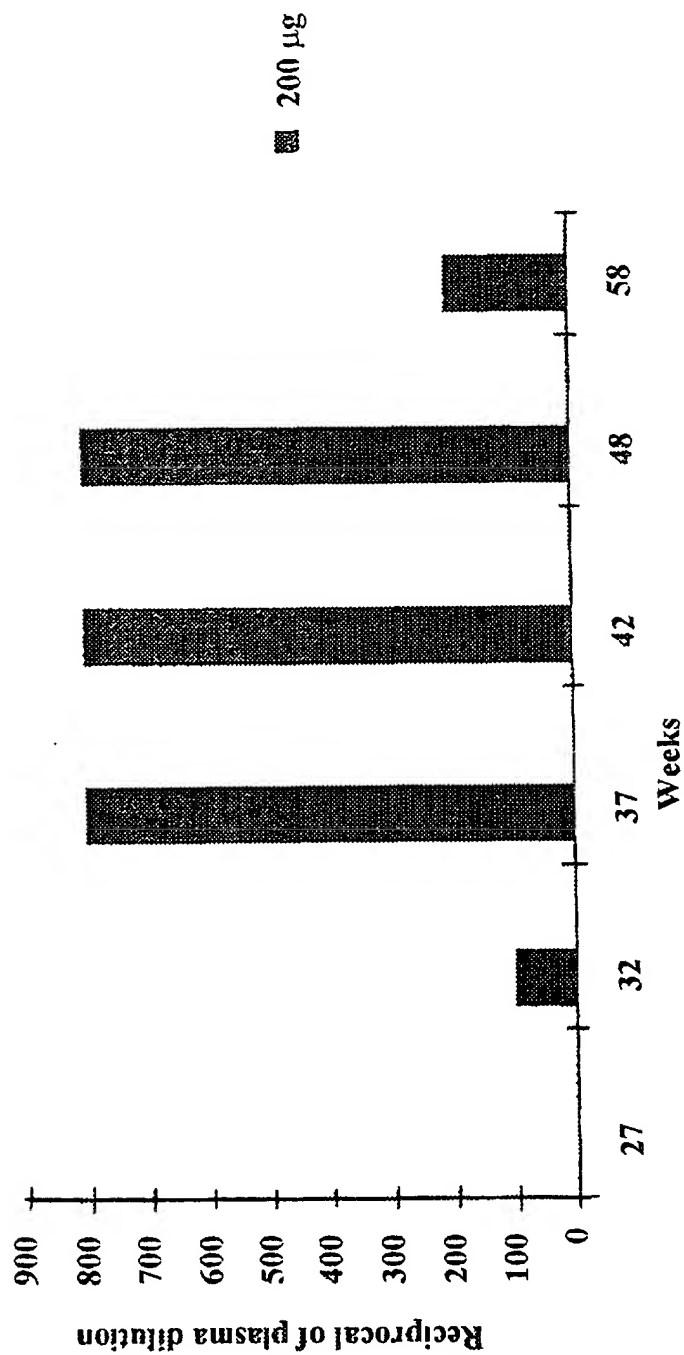


FIG. 12

14/17

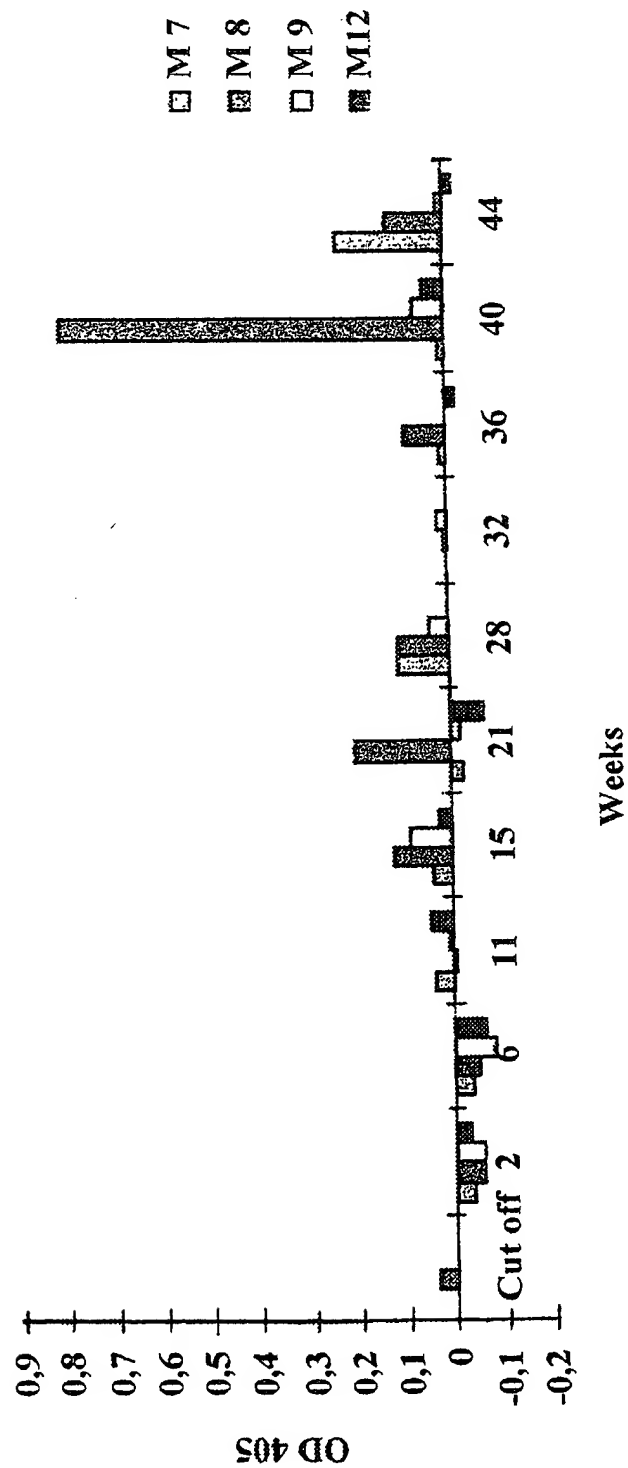


FIG. 13

15/17

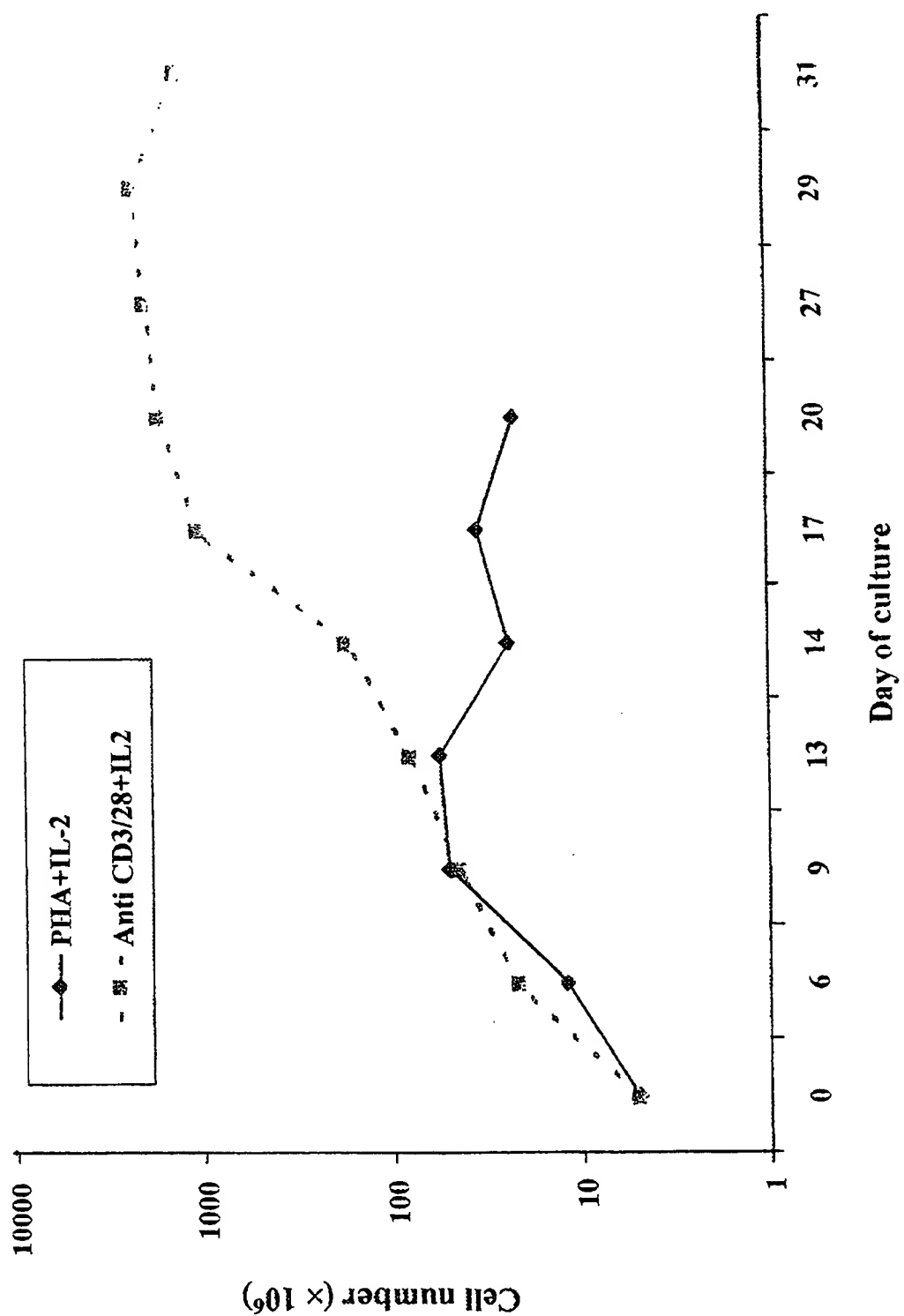


FIG. 14

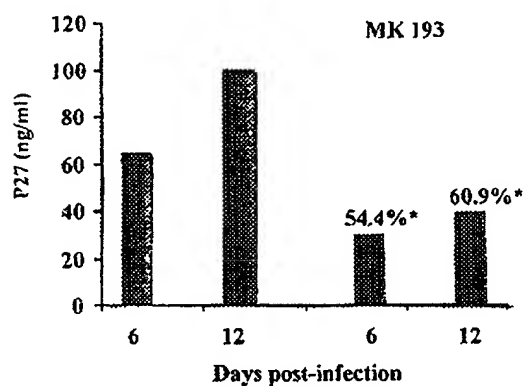


FIG. 15A

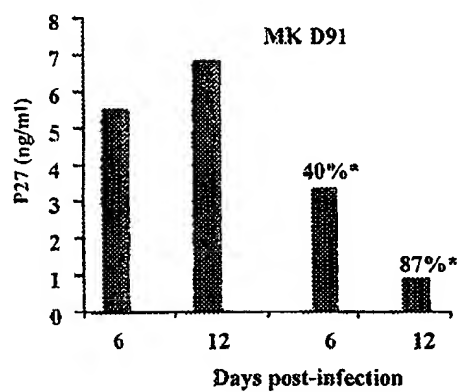


FIG. 15B

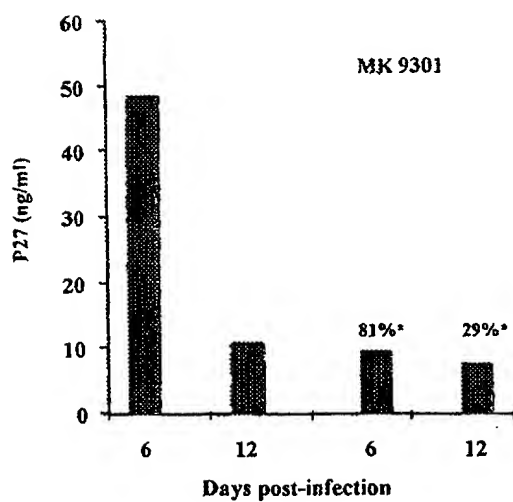


FIG. 15C

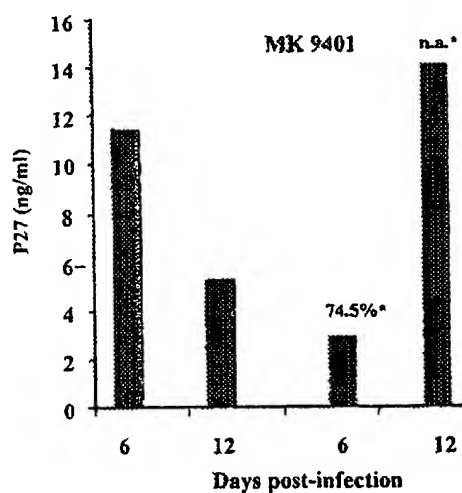


FIG. 15D

*: Percentage of inhibition

17/17

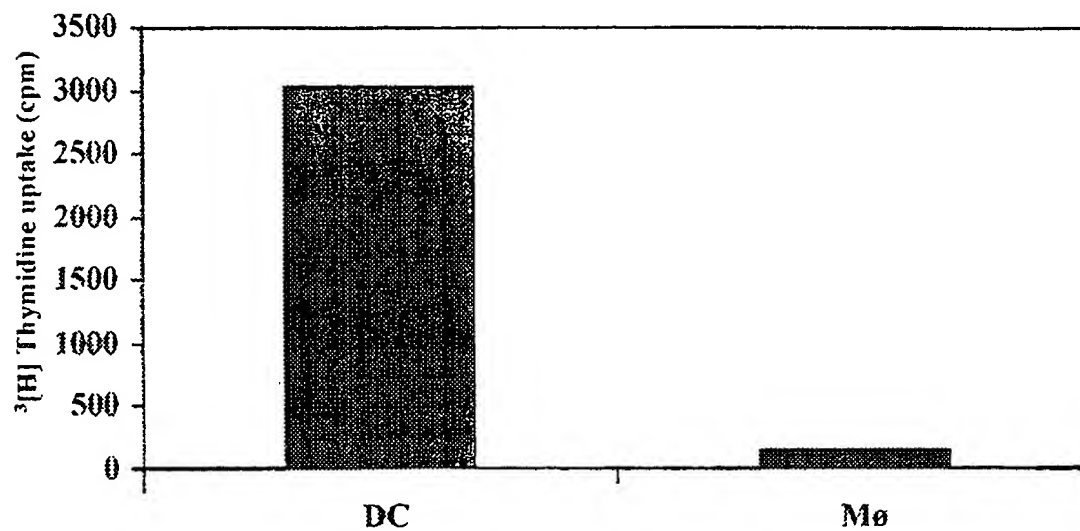


FIG. 16A

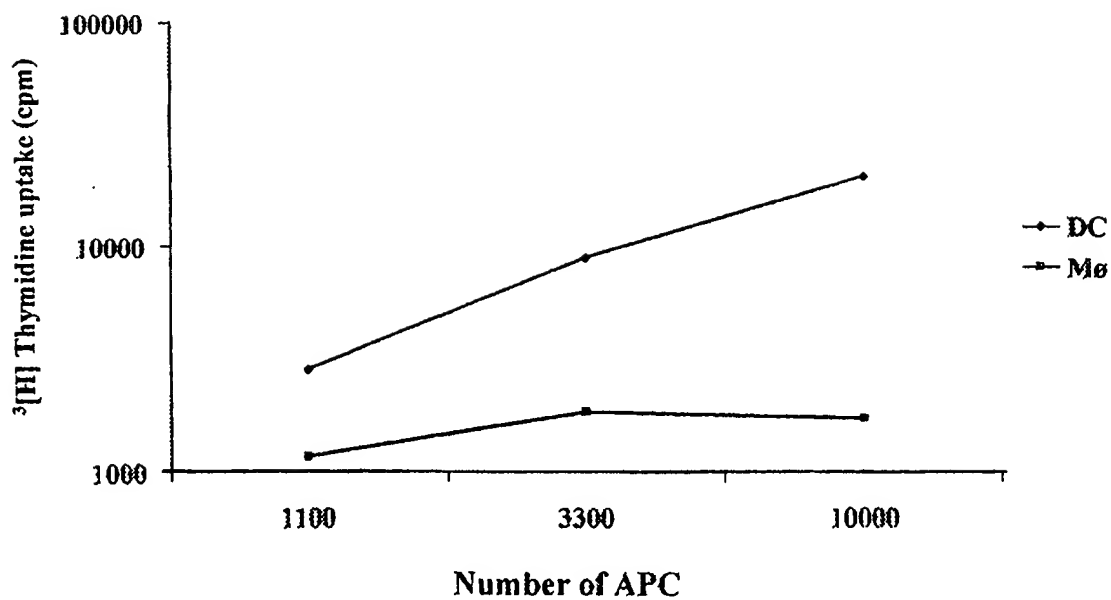


FIG. 16B

SEQUENCE LISTING

<110> ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'

<120> HIV-1 Tat, or derivatives thereof, alone or in
combination, for prophylactic and therapeutic
vaccination against AIDS, tumors and related syndromes

<130> 1354PTWO

<140> RM97A000743

<141> 1997-12-01

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 261

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 1

atggagccag tagatcctag actagagccc tggaagcatc caggaagtca gcctaaaact 60
gctgtaccaa attgctattg taaaaagtgt tgccttcatt gccaaagttg ttccataaca 120
aaagccttag gcatctccta tggcaggaag aagcggagac agcgacgaag acctcctcaa 180
ggcagtcaga ctcatcaagt ttctctatca aagcagccca cctcccaatc cagaggggac 240
ccgacaggcc cgaaggaata g 261

<210> 2

<211> 83

<212> PRT

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 2

Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser Gln

1 5 10 15

Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe His

20 25 30

Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Ile Ser Tyr Gly Arg Lys Lys

35 40 45

Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr His Gln Val

50 55 60

Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp Pro Thr Gly

65 70 75 80

Pro Lys Glu

<210> 3

<211> 260

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 3

atggagccag tagatcctag actagagccc tggaagcatc caggaagtca gcctaaaact 60
gcggtagcaa ttgctattgt aaaaagtgtt gctttcattg ccaagttgt ttccataaca 120

aagccttagg catctcctat ggcaggaaga agcggagaca ggcaggaaga cctcctcaag 180
 gcagtgcagac tcatacaagt ttctatcaaa agcagccac ctcccaatcc cgaggggacc 240
 cgacaggccc gaaggaatag 260

<210> 4

<211> 261

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 4

atggagccag tagatcctag actagagccc tggaagcatc caggaagtc gcctaaaact 60
 gctgtacca atgtctattg taaaaagtgt tgctttcatt gccaaagttg ttccataaca 120
 aacgccttag gcatctccta tggcaggaag aagcggagac agcgacgaag acctcctcaa 180
 ggcagtcaga ctatcaagt ttcttatca aagcagccca cctcccaatc ccgaggggac 240
 ccgacaggcc cgaaggaata g 261

<210> 5

<211> 252

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 5

atggagccag tagatcctag actagagccc tggaagcatc caggaagtc gcctaaaact 60
 gctgtacca atgtctattg taaaaagtgt tgctttcatt gccaaagttg ttccataaca 120
 aaagccttag gcatctccta tggcaggaag aagcggagac agcgacgaag acctcctcaa 180
 ggcagtcaga ctatcaagt ttcttatca aagcagccca cctcccaatc cccgacaggc 240
 ccgaaggaat ag 252

<210> 6

<211> 252

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 6

atggagccag tagatcctag actagagccc tggaagcatc caggaagtc gcctaaaact 60
 gctgtacca atgtctattg taaaaagtgt tgctttcatt gccaaagttg ttccataaca 120
 aacgccttag gcatctccta tggcaggaag aagcggagac agcgacgaag acctcctcaa 180
 ggcagtcaga ctatcaagt ttcttatca aagcagccca cctcccaatc cccgacaggc 240
 ccgaaggaat ag 252

<210> 7

<211> 86

<212> PRT

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 7

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Gly Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
 20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
 35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
 50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu

85

<210> 8
<211> 86
<212> PRT
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 8
Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15
Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30
His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Thr Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
50 55 60
His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
65 70 75 80
Pro Thr Gly Pro Lys Glu
85

<210> 9
<211> 83
<212> PRT
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 9
Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15
Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30
His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45
Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
50 55 60
His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Pro Thr Gly
65 70 75 80
Pro Lys Glu

<210> 10
<211> 83
<212> PRT
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 10
Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30

His Cys Gln Val Cys Phe Ile Thr Thr Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Pro Thr Gly
65 70 75 80

Pro Lys Glu

<210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 11

Met Glu Pro Val Asp Pro Arg Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15

Gln Pro Lys Thr
20

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 12

Ala Cys Thr Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe His Cys Gln Val
1 5 10 15

Cys Phe Ile Thr
20

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 13

Gln Val Cys Phe Ile Thr Lys Ala Leu Gly Ile Ser Tyr Gly Arg Lys
1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 14

Ser Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10 15

<210> 15
<211> 16
<212> PRT
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 15
Arg Pro Pro Gln Gly Ser Gln Thr His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln
1 5 10 15

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 16
His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp
1 5 10 15

<210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 17
Pro Thr Ser Gln Ser Arg Gly Asp Pro Thr Gly Pro Lys Glu
1 5 10

<210> 18
<211> 15
<212> DNA
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 18
atggcaggaa gaagc 15

<210> 19
<211> 15
<212> DNA
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 19
ctattcttta gttcc 15

<210> 20
<211> 15
<212> DNA
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 20
atgggtggca agtgg 15

<210> 21
<211> 15
<212> DNA
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 21
tcagcagtc ttgta 15

<210> 22
<211> 15
<212> DNA
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 22
atgggtgcga gagcg 15

<210> 23
<211> 15
<212> DNA
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 23
ttattgtgac gaggg 15

<210> 24
<211> 15
<212> DNA
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 24
atgtggcccc ctggg 15

<210> 25
<211> 15
<212> DNA
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 25
ttaggaagca ttacg 15

<210> 26
<211> 15
<212> DNA
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 26
atgagaattt cgaaa 15

<210> 27
<211> 15
<212> DNA
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 27
tcaagaagtg ttgat 15

<210> 28
<211> 15
<212> DNA
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 28
atggagccag tagat 15

<210> 29
<211> 15
<212> DNA
<213> Aids-associated retrovirus

<400> 29

ctattccttc gggcc

15

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 30

ggcccgaagg aaatggcagg aagaagc

27

<210> 31

<211> 27

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 31

ggcccgaagg aaatgggtgg caagtgg

27

<210> 32

<211> 27

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 32

ggcccgaagg aaatgggtgc gagagcg

27

<210> 33

<211> 27

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 33

ggcccgaagg aaatgtggcc ccctggg

27

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Aids-associated retrovirus

<400> 34

ggcccgaagg aaatgagaat ttgaaa

27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/07721

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K39/21 C07K14/16 C12N15/49 C12N15/86 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 95 31999 A (IMMUNOBIOLOGY RESEARCH INSTITUTE) 30 November 1995 see the whole document	1,42,43 2-41, 44-61
X A	KIM D T ET AL: "Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1997 AUG 15) 159 (4) 1666-8, XP002083064 see the whole document	1,42,43 2-41, 44-61
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents *

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 May 1999

Date of mailing of the international search report

04/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/07721

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HINKULA J ET AL: "Nucleic acid vaccination with HIV regulatory genes: a combination of HIV-1 genes in separate plasmids induces strong immune responses" VACCINE, vol. 15, no. 8, June 1997, page 874-878 XP004075674 see the whole document ---	1,42,43
X	HINKULA J ET AL: "Recognition of prominent viral epitopes induced by immunization with human immunodeficiency virus type 1 regulatory genes." JOURNAL OF VIROLOGY, (1997 JUL) 71 (7) 5528-39, XP002083065 cited in the application see the whole document ---	1,42,43
X	WO 94 15634 A (RATH M.) 21 July 1994 see the whole document ---	1,42,43
A	WO 94 03596 A (UNIVERSITY OF HAWAII) 17 February 1994 see the whole document ---	161
P,X	WO 98 17309 A (ERASMUS UNIVERSITY ROTTERDAM) 30 April 1998 see the whole document	1,42,43
A		2-41, 44-61
A	SAMANIEGO F ET AL: "Inflammatory cytokines induce endothelial cells to produce and release basic fibroblast growth factor and to promote Kaposi's sarcoma-like lesions in nude mice." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1997 FEB 15) 158 (4) 1887-94, XP002103367 see the whole document -----	1-61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP 98/07721

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claim 61 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int. l. Application No

PCT/EP 98/07721

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9531999 A	30-11-1995	AU 2638295 A CA 2190972 A EP 0767678 A	18-12-1995 30-11-1995 16-04-1997
WO 9415634 A	21-07-1994	NONE	
WO 9403596 A	17-02-1994	AU 4794593 A	03-03-1994
WO 9817309 A	30-04-1998	AU 4719597 A	15-05-1998

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/07721

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K39/21 C07K14/16 C12N15/49 C12N15/86 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 95 31999 A (IMMUNOBIOLOGY RESEARCH INSTITUTE) 30 November 1995 see the whole document	1,42,43 2-41, 44-61
X A	KIM D T ET AL: "Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1997 AUG 15) 159 (4) 1666-8, XP002083064 see the whole document	1,42,43 2-41, 44-61



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents *

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 May 1999

Date of mailing of the international search report

04/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte lional Application No

PCT/EP 98/07721

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HINKULA J ET AL: "Nucleic acid vaccination with HIV regulatory genes: a combination of HIV-1 genes in separate plasmids induces strong immune responses" VACCINE, vol. 15, no. 8, June 1997, page 874-878 XP004075674 see the whole document ---	1,42,43
X	HINKULA J ET AL: "Recognition of prominent viral epitopes induced by immunization with human immunodeficiency virus type 1 regulatory genes." JOURNAL OF VIROLOGY, (1997 JUL) 71 (7) 5528-39, XP002083065 cited in the application see the whole document ---	1,42,43
X	WO 94 15634 A (RATH M.) 21 July 1994 see the whole document ---	1,42,43
A	WO 94 03596 A (UNIVERSITY OF HAWAII) 17 February 1994 see the whole document ---	161
P,X	WO 98 17309 A (ERASMUS UNIVERSITY ROTTERDAM) 30 April 1998	1,42,43
A	see the whole document	2-41, 44-61
A	SAMANIEGO F ET AL: "Inflammatory cytokines induce endothelial cells to produce and release basic fibroblast growth factor and to promote Kaposi's sarcoma-like lesions in nude mice." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1997 FEB 15) 158 (4) 1887-94, XP002103367 see the whole document -----	1-61

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP 98/07721

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claim 61 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/07721

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9531999 A	30-11-1995	AU 2638295 A CA 2190972 A EP 0767678 A	18-12-1995 30-11-1995 16-04-1997
WO 9415634 A	21-07-1994	NONE	
WO 9403596 A	17-02-1994	AU 4794593 A	03-03-1994
WO 9817309 A	30-04-1998	AU 4719597 A	15-05-1998